

PCT/JP03/16176

17.12.03

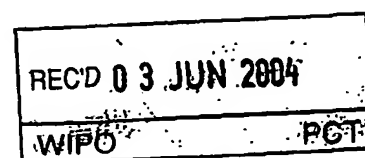
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 1月15日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-007657  
[ST. 10/C]: [JP2003-007657]



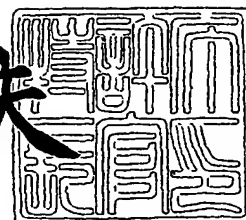
出 願 人  
Applicant(s): 独立行政法人 科学技術振興機構

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月21日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 PA903379  
【提出日】 平成15年 1月15日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本駒込 1-26-10-411

【氏名】 清水 孝雄

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区本郷 3-38-11-1102

【氏名】 石井 聡

【発明者】

【住所又は居所】 東京都文京区西片 2-19-14-501

【氏名】 野口 響子

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 沖村 憲樹

【代理人】

【識別番号】 100102668

【弁理士】

【氏名又は名称】 佐伯 憲生

【電話番号】 03-5205-2521

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 039251

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規リゾホスファチジン酸受容体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 からなるリゾホスファチジン酸 (L P A) 受容体。

【請求項 2】 L P A が、1-アシル-L P A である請求項 1 に記載の L P A 受容体。

【請求項 3】 p 2 y 9 が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するものである請求項 1 又は 2 に記載の L P A 受容体。

【請求項 4】 Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 の、リゾホスファチジン酸 (L P A) 受容体としての使用。

【請求項 5】 L P A が、1-アシル-L P A である請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】 p 2 y 9 が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するものである請求項 4 又は 5 に記載の使用。

【請求項 7】 請求項 1～3 のいずれかに記載の L P A 受容体を用いて、当該受容体に対する作動物質又は拮抗物質をスクリーニングする方法。

【請求項 8】 癌細胞の浸潤に対する拮抗物質をスクリーニングする方法である請求項 7 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規なリゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: L P A) の受容体に関する。より詳細には、本発明は、Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 からなるリゾホスファチジン酸 (L P A) 受容体、リゾホスファチジン酸 (L P A) 受容体としての使用、及びそれを用いて当該受容体に対する作動物質又は拮抗物質をスクリーニングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) は、グリセロリン脂質の 1 種であり、グリセリン骨格のひとつの水酸基に脂質が結合した物質である。LPA は、グリセロリン脂質がホスホリパーゼなどの作用により、グリセロリン脂質の 2 個の脂質部分のうちの 1 個の脂質部分が加水分解されて生ずる物質であり、1-アシルグリセロール-3-リン酸、2-アシルグリセロール-3-リン酸、1-アルケニル-グリセロール-3-リン酸などが LPA の代表例として知られている。

LPA は、生体内においては極微量しか存在せず、グリセロリン脂質の生合成の中間体や分解物である程度の認識しかされていなかったけれども、近年になって LPA が様々な生理活性を有し、特に血清中に存在する脂質性の増殖因子の主要な成分であることが明らかにされて (非特許文献 1 参照) からは、生理活性脂質の 1 種として注目を集めてきた。

LPA は、細胞増殖促進作用を有し、障害を受けた組織の修復に必要な物質であることが見出され、また、LPA には、神経細胞の成熟化に必要な神経突起を退縮させる作用や、ある種の癌細胞の浸潤を誘導する作用がことも報告されている。さらに、LPA は、平滑筋収縮作用、血小板凝集作用、細胞死の抑制、細胞の走化性の亢進作用など、様々な組織において様々な作用を有していることが知られてきた。さらに、血漿中の LPA を検出して卵巣がんを検出する方法 (特許文献 1 参照) や、試料中の LPA などのリゾリン酸を測定する方法 (特許文献 2 参照) や、LPA を特異的に加水分解するリゾホスファチジン酸ホスファターゼの製造方法 (特許文献 3 参照) や、ヒトリゾホスファチジン酸ホスファターゼのクローニング (特許文献 4 参照) などに関する特許出願も行われてきている。

このように LPA は、単に中間物や分解物ではなく、様々な生理活性を有するメディエーターの 1 種であることがわかってきた。したがって、LPA は、血小板活性化因子 (PAF) やスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) などと共に「リゾリン脂質メディエーター」の 1 種であると考えられるようになってきた。

### 【0003】

LPA は、細胞膜表面に存在する G タンパク質共役型の受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) に結合してその生理作用を発現すると考えられて

きた。即ち、LPAの受容体は7回膜貫通型のGPCRであると考えられていたが、その実体は長らく不明であった。それは、LPAがリゾリン脂質の1種であり、脂溶性の物質であることから、膜との結合実験が非常に難しいことや、よいアンタゴニストが存在しないことなどから、受容体の存在そのものも疑問視されていたからである。

しかし、1996年に、LPAの受容体としてvzg-1（非特許文献2参照）、及びPSP24（非特許文献3参照）と命名されたLPAの受容体遺伝子がクローニングされた。vzg-1は、マウス脳の発生過程の脳質層において細胞周期に伴って神経芽細胞のエレベーター運動が観察され、この細胞に特異的な7回膜貫通型のGPCRであることから、vzg-1（ventricular zone gene-1）と命名された。vzg-1は、それまでに単離されていたヒツジ由来のオーファン受容体であるedg-2遺伝子のマウスホモログであることがわかり、現在ではedg-2遺伝子として知られている。

そして、ESTデータベース上では、edg-2（vzg-1）の他に、edg-1、edg-3、edg-4遺伝子などの多くの相同性を示す配列が登録されており、これらが一群のEDG（endothelial cell differentiation gene）ファミリーを形成することが明らかになった。このEDGファミリーは、その相同性から2つのグループに細分され、その1つはedg-2及びedg-4などのLPAのレセプターとして機能するグループであり、他のひとつはedg-1及びedg-3などのS1P（スフィンゴシン1リン酸）の受容体として機能するものである。

また、PSP24遺伝子は、前述してきたedg-2遺伝子とはアミノ酸配列上、相同性がほとんど無いが、マウス神経系やヒト胎児脳においても相同遺伝子が発現しており、この遺伝子産物もLPAに対する反応性を有することから独立のグループを形成すると考えられている。また、アフリカツメガエル卵母細胞のPSP24遺伝子の塩基配列に基づいて、ヒト成人の脳組織のcDNAライブラリーからヒト型のPSPS24遺伝子も見出されている（特許文献5参照）。

#### 【0004】

EDGファミリーやPSP24は、GPCRの1種であり、図1に現在までに

知られている GPCR を示す。図 1 はこれらのタンパク質のアミノ酸配列の相同性に基づいて相同性の大きいものを近くに配置し、相同性の小さいものを遠くに配置した系統樹である。図 1 中の数字は各タンパク質間の相同性の低さを示す尺度となる相対値である。また、図 1 中の黒丸印は、脂質の受容体として知られているものを示し、灰色は脂質以外の受容体として知られているものを示し、それらの外側にリガンドとなる物質の総称が記載されている。EDG ファミリーは図 1 中では右下側に表示されている。また、PSP24 はほぼ中央の下側に示されている。図 1 中の白丸印はそのリガンドが未だ知られていないオーファン受容体であることを示している。

本発明の GPCR である p2y9 は、図 1 中では左側の下方に表示されており、従来の EDG ファミリーや PSP24 とはアミノ酸配列の相同性が全く異なるものであることが図 1 からわかる。

GPCR については現在でも新規なものが見出されており、例えば、特開 2002-355045 号（特許文献 6）、特開 2002-17378 号（特許文献 7）などの特許出願（特許文献 8～18 参照）として公開されている。また、GPCR の機能を改変させる方法（特許文献 19 参照）や、G2A 受容体の転写の調節方法（特許文献 20 参照）や、GPCR 活性のスクリーニング方法（特許文献 21 参照）についても特許出願がされてきている。

#### 【0005】

##### 【特許文献 1】

特開 2002-328132 号

##### 【特許文献 2】

特開 2002-017398 号

##### 【特許文献 3】

特開 2000-152782 号

##### 【特許文献 4】

再表 WO00/031275 号

##### 【特許文献 5】

再表 WO99/024569 号

【特許文献 6】

特開 2002-355045号

【特許文献 7】

特開 2002-17378号

【特許文献 8】

特開 2001-245674号

【特許文献 9】

特開 2001-245673号

【特許文献 10】

特開 2001-245672号

【特許文献 11】

特開 2001-211889号

【特許文献 12】

特開 2001-190281号

【特許文献 13】

特開 2001-186888号

【特許文献 14】

特開 2001-169786号

【特許文献 15】

特開 2001-161385号

【特許文献 16】

特開 2001-161383号

【特許文献 17】

特開 2001-161382号

【特許文献 18】

特表 2002-501083号

【特許文献 19】

特表 2002-523091号

【特許文献 20】



特表 2001-523456号

【特許文献 21】

特表平 11-505718号

【非特許文献 1】

フォン コルベン イーら、セル、59巻、45-54頁、1989年 (van Corven E., et al., Cell, 59, 45-54 (1989))

【非特許文献 2】

ヘチャト ジェー エイチら、ジャーナル セル バイオロジー、135巻、1071-1083頁 (1996年) (Hecht, J.H., et al., J. Cell. Biol., 135, 1071-1083 (1996))

【非特許文献 3】

グオ ゼットら、プロシーディング ナショナル アカデミック サイエンス ユーエスエー、93巻、14367-14372頁、1996年 (Guo, Z., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 14367-14372 (1996))

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

LPAは生体内において様々な生理活性を有するリゾリン脂質メディエーターの1種であるが、その受容体については未だ十分に解明されておらず、LPAの受容体を解明することは、LPAが関与する様々な生理活性作用や各種の疾患の治療や予防に重要なことである。したがって、LPAの新規な受容体を得ることができれば、新しいタイプのLPA受容体拮抗剤などの医薬品のスクリーニングや評価など幅広く医薬品の開発に利用することができる。

本発明は、LPAの新規な受容体を提供するものであり、それを用いたLPA受容体拮抗剤などの医薬品のスクリーニング方法を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、図1に示される種々のGタンパク質共役型受容体のアミノ酸配列の相同性をもとに構築した系統樹における、血小板活性化因子受容体(PAFR)に相同性があるオーファン受容体(図1の左側に示される。)について検討

しきた。その結果、意外なことに血小板活性化因子受容体（PAFR）に相同性があるオーファン受容体のひとつである p2y9 が、血小板活性化因子（PAF）よりも LPA に対して強く反応することを見出した。即ち、本発明者らは、従来知られている LPA 受容体とは全くタイプの異なる新たな LPA 受容体を見出し、本発明を完成した。

#### 【0008】

本発明は、Gタンパク質共役型タンパク質 p2y9 からなるリゾホスファチジン酸（LPA）受容体としての用途に関する。より詳細には、Gタンパク質共役型タンパク質 p2y9 のリゾホスファチジン酸（LPA）受容体としての使用に関する。さらに詳細には、Gタンパク質共役型タンパク質 p2y9 が配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するものである p2y9 のリゾホスファチジン酸（LPA）受容体としての使用に関する。

また、本発明は、前記した本発明の LPA 受容体を用いて、当該受容体に対する作動物質又は拮抗物質をスクリーニングする方法に関する。

本発明は、Gタンパク質共役型タンパク質 p2y9 がリゾホスファチジン酸（LPA）の受容体として機能するものであることを明らかにするものである。即ち、LPA が Gタンパク質共役型タンパク質 p2y9 のリガンドとして機能することを明らかにするものである。

#### 【0009】

本発明者らは、血小板活性化因子受容体（PAFR）に相同性があるオーファン受容体のうち GPR34、p2y5、p2y9（別名 GPR23）、及び p2y10 に注目し、これらのリガンドを検討してきた。これらの受容体は、いずれも血小板活性化因子受容体（PAFR）とアミノ酸配列において相同性を有していることから、血小板活性化因子（PAF）又はその関連物質をリガンドとしていることが予想されていたが、p2y9（別名 GPR23）は、血小板活性化因子（PAF）又はその関連物質とは反応性を示さず、意外にも LPA と大きな反応性を示し、LPA をリガンドとする受容体であることを見出した。p2y9 のアミノ酸配列は、LPA 受容体として従来から知られている EDG-2、EDG-4、EDG-7、及び PSPS24 とはほとんど相同性を有しておらず、この

ことは図1の系統樹からも理解されたとおりであり、従来から知られているLPA受容体とは全く異なる新しいタイプのLPA受容体を見出したことになる。

【0010】

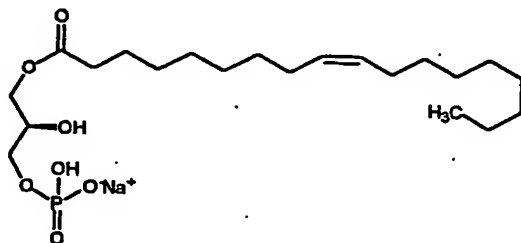
本発明者らは、GPR34、p2y5、p2y9（別名GPR23）、及びp2y10のそれぞれのアミノ酸配列のN末端にHAタグと呼ばれる9アミノ酸残基からなる外来のペプチドを付加したアミノ酸配列をコードするDNAを、それぞれpCXN2.1ベクターに組み込み、CHO細胞にトランスフェクションし、細胞表面上のHAタグの発現レベルが高いクローンを選択して、これらを安定的に発現するクローンを得た。

図2に、HAタグの付いたp2y9をコードするDNAをpCXN2.1ベクターのKpnIとNheIの間に組み込んだ発現ベクターを示す。他の受容体についても、それぞれ同様にベクターを構築した。実験に使用したp2y9は370個のアミノ酸からなるタンパク質であり、このアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

また、これらの実験で使用したLPAとしては、次の式、

【0011】

【化1】



【0012】

で示される、1-オレオイル-LPAを用いた。

各受容体のCHOクローンをを用いて、200種以上の脂質（バイオモル社脂質

ライブラリー由来) やヌクレオチドについて、CHO細胞のカルシウム濃度の変化についてのスクリーニングを行った。このスクリーニングに際しては、ポジティブコントロールとして $1\mu\text{M}$ のATP、 $10\mu\text{M}$ のATP、及び $100\mu\text{M}$ のATPを使用した。これは、CHO細胞はもともとATP受容体を発現しているため、ATPの添加によりカルシウム濃度が大きく変化する。この実験では、このポジティブコントロール、即ち、ATPの添加によりいずれの濃度の場合にも、測定機器の針が振り切れる程大きな細胞内カルシウム濃度の変化が認められた。このことは、この実験自体がうまくいっていることの証明になっている。

一方、トランスフェクションにより、発現している受容体に特異的な細胞内のカルシウム濃度の上昇は、p2y9を発現したクローンがLPAと反応したときに認められた。このスクリーニングにより、p2y9をコードするDNAをトランスフェクションしたCHO細胞に大きなカルシウム濃度の変化が見られることがわかった。

さらに、各受容体のCHO細胞のクローンを用いて、 $10\mu\text{M}$ のLPAによる各細胞のカルシウム濃度の変化を詳細に検討した結果を図3に示す。図3の縦軸はカルシウム濃度(RFU)を示し、横軸は時間(秒)を示す。図3中の黒丸印(●)はGPR34の場合を示し、白四角印(□)はp2y5の場合を示し、白三角印(△)はp2y9の場合を示し、バツ印(×)はp2y10の場合をそれぞれ示している。

この結果からも明らかなように、 $10\mu\text{M}$ のLPAによりp2y9のみが特異的にカルシウム濃度の増加を示すこと、即ち、LPAがp2y9のリガンドになっていることがわかった。

### 【0013】

次に、これらの4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクローンの細胞を用いて、細胞内のサイクリックAMP(cAMP)の濃度変化について検討した。バイオモル社の脂質ライブラリーの中からの59種類の脂質、及び17種類のヌクレオチド類を用いて、それぞれ室温で30分間反応させた。

結果を図4～図10に示す。使用した脂質類及びヌクレオチド類は各図に記載のとおりである。図4～図10の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した

各脂質類又はヌクレオチド類を示している。図10の右端はコントロールである。図4～図10に各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10をそれぞれ示している。

この結果、図8の左から5番目に示されるように、LPAに対するp2y9の場合は、有意にcAMPの濃度の上昇がみられることがわかった。

#### 【0014】

次に、CHO細胞のクローンについて検討した。p2y9を安定的に発現している4つのCHO細胞のクローン、#01、#09、#15、及び#20の各々について、細胞内にカルシウムを取り込ませる実験を行った。種々の濃度のLPAを加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した。陰性対照サンプルとして、pCXN2.1ベクターのみをトランスフェクションしてネオマイシン耐性を獲得したCHO細胞を用いた。

結果を図11の(A)～(D)に示す。各グラフの横軸はLPAの濃度(nM)を示し、縦軸はカルシウムの増加量(nM)を示す。図11の(A)は#01のクローンの場合であり、図11の(B)は#09のクローンの場合であり、図11の(C)は#15のクローンの場合であり、図11の(D)は#20のクローンの場合である。各(A)～(D)の黒菱形印(◆)は各クローンの場合を示し、灰色の四角印(■)は陰性対照の場合を示す。

CHO細胞は、元々LPA受容体を持っている細胞であるから、ベクターのみを導入した細胞であってもLPAに対して反応する。しかし、p2y9が導入されたいずれのクローンにおいても、LPAの濃度依存的にp2y9が導入されたクローンのほうが顕著に細胞内のカルシウム濃度が増加することがわかった。

#### 【0015】

同様に、細胞内のカルシウム濃度の変化をトロンビン(0.1NIH単位/m1)、PAF(1 $\mu$ M)、及びATP(10 $\mu$ M)について検討した結果を図12に示す。図12の縦軸はカルシウムの増加量(nM)を示し、横軸は各添加物を示す。各棒グラフは、左から陰性対照のベクターのみを導入したCHO細胞、p2y9のクローン#01、クローン#09、クローン#15、クローン#20をそれぞれ示している。

この結果、トロンビン、PAF、及びATPについては、p2y9を導入した細胞も陰性対照の細胞と変わりが無いことがわかった。

#### 【0016】

次に、p2y9またはp2y5を安定的に発現しているCHO細胞のクローンを用いて、百日咳毒素(PTX)の存在下又は非存在下で、種々の濃度のLPAを加えて室温で30分間処理したときの細胞内cAMP濃度を測定した。陰性対照サンプルとして、pCXN2.1ベクターのみをトランスフェクションしてネオマイシン耐性を獲得したCHO細胞を用いた。

結果を図13の(A)、(B)に示す。図13の(A)はcAMPを上昇させる作用を有するフォルスコリン(5 $\mu$ M)で処理しなかった場合であり、図13の(B)はフォルスコリン(5 $\mu$ M)で処理した場合である。各図の横軸はLPAの濃度( $\mu$ M)を示し、縦軸はcAMPの濃度の変化の比を示す。各図の黒四角印(■)はp2y9のクローンの場合であり、灰色四角印(□) (注:原図では赤色で示されている。)はp2y5のクローンの場合を示す。黒菱形印(◆) (注:原図では青色で示されている。)は陰性対照のベクターのみのクローンの場合を示す。各図の実線は、百日咳毒素(PTX)の非存在下の場合であり、破線は百日咳毒素(PTX)の存在下の場合である。

この結果、p2y9はLPAに反応してcAMPの濃度を上昇させるが、p2y5及び陰性対照ではLPAに対してcAMPの濃度の上昇はみられなかった。Gタンパク質Gi/Goの阻害剤である百日咳毒素(PTX)の存在により(各図の破線で示される場合。)、cAMPの濃度の上昇レベルは増強した。これは、CHO細胞が元々持っているLPA受容体が百日咳毒素(PTX)に感受性を持っており、かつcAMPの濃度を下降させる作用があるためと考えられる。また、フォルスコリンの存在下(図13の(B))では、p2y9のLPAに対するcAMPの濃度の上昇が増強されている。

#### 【0017】

p2y5は、344個のアミノ酸からなるタンパク質であり、p2y9とは56.2%の相同性がある。両者のアミノ酸の比較を図14に示す。図14の上の段はp2y9であり、下の段はp2y5である。アミノ酸が同じ位置に有る場合

には両者の間にアスタリスク (\*) が付されている。両者は比較的相同性が高いにもかかわらず、LPAに対する反応性を全く異にしており、血小板活性化因子受容体 (PAFR) に相同性があるタンパク質 (図1の系統樹において左側に示されている。) の中でも、本発明の p2y9 のみが LPA に対して特異的に作用するものであることがわかる。

#### 【0018】

CHO細胞は元々LPA受容体を持っている細胞であるが、次に元々はLPA受容体を持っていない細胞について p2y9 を導入して、その反応性を検討した。LPA受容体を持っていない細胞として、RH7777細胞及びB103細胞を使用した。

pCXN2. 1ベクターに挿入されたHAタグ付きの p2y9 または p2y5 をコードするDNAを、RH7777細胞またはB103細胞へトランスフェクションし、一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分を得た。陰性対照サンプルでは、受容体をコードするDNAの代わりに pCXN2. 1ベクターをトランスフェクションしたものを使用した。この膜画分を、それぞれの濃度における総結合量を求めるために、1 nM、3 nM、又は10 nMのトリチウムラベルされたLPAと混ぜ合わせ、4℃で60分間反応させた。これと平行して、それぞれの濃度における非特異的結合量を求めるために、500倍濃度のトリチウムラベルされていないLPAを含んだ反応液でも、膜画分とトリチウムラベルされたLPAを同様に反応させた。反応液をGF/Cガラスフィルターで濾過し、ガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされたLPAの量とした。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を引いて求めた。

結果を図15及び図16に示す。図15はRH7777細胞を用いた場合であり、図16はB103細胞を用いた場合である。図15及び図16のそれぞれの、(A)は陰性対照の場合を示し、(B)はp2y5の場合を示し、(C)はp2y9の場合を示す。各グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの添加量 (nM) であり、縦軸は測定された放射能の量 (dpm) を示す。各グラフの黒色の棒は総結合量であり、その右側の灰色の棒は非特異的結合量である。灰色三

角印 (▲) (注: 原図では赤色で示されている。) は、総結合量から非特異的結合量を引いて求めた特異的結合量を示している。

この結果、p2y9 はいずれの細胞においても LPA と特異的に結合するものであることがわかった。

#### 【0019】

このトランスフェクションした RH7777 細胞から得られた一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分を用いて、p2y9 の他の脂質との反応性を検討した。

前記した方法で得られた膜画分を、5 nM のトリチウムラベルされた LPA と混ぜ合わせ、4℃ で 60 分間反応させた。この値を、LPA だけの総結合量として対照とした (得られた値は、図 17 のグラフ内では “Buffer” と記載している。)。これと平行して、1  $\mu$ M のトリチウムラベルされていない種々の脂質 (LPC: リゾフォスファチジルコリン、LPE: リゾフォスファチジルエタノールアミン、LPS: リゾフォスファチジルセリン、LPG: リゾフォスファチジルグリセロール、PA: フォスファチジン酸、PAF: 血小板活性化因子、S1P: スフィンゴシン 1-リン酸、SPC: シフィンゴシルフォスホリルコリン) をそれぞれ含む、5 nM のトリチウムラベルされた LPA を同様に反応させた。

反応後、反応液を GF/C ガラスフィルターで濾過し、ガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされた LPA の量とした。

結果を図 17 に示す。図 17 の縦軸は測定された放射能の量 (dpm) を示し、横軸は添加した各脂質を示す。

LPA と一緒に添加されたこれらの脂質が、LPA と同様に p2y9 と親和性を有するものであるならば、多量に添加されたこれらの脂質が競争的に p2y9 に結合し、結果的にラベルされた LPA の p2y9 への結合が阻害され、ラベルされた LPA の結合量が減少することになる。しかし、図 17 に示されるように、p2y9 とラベルされた LPA の結合量は、LPA 以外の他の脂質により減少しておらず、調べた脂質は全て p2y9 への親和性が LPA ほど高くないことが



示された。即ち、p2y9は、これらの脂質よりもLPAと特異的に結合するものであることが示された。

### 【0020】

次に、前記で使用してきたRH7777細胞から得られた一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分を用いて、p2y9に対するLPAの結合の動力的検討を行った。

RH7777細胞由来の膜画分を、種々の濃度のトリチウムラベルされたLPAと混ぜ合わせ、4℃で60分間反応させて、総結合量を求めた。これと平行して、10μMのトリチウムラベルされていないLPAを含んだ反応液でも、膜画分とトリチウムラベルされたLPAを同様に反応させて、非特異的結合量を求めた。反応液をGF/Cガラスフィルターで濾過し、ガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされたLPAの量とした。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を引いて求めた。陰性対照サンプルでは、受容体をコードするDNAの代わりにpCXN2.1ベクターをトランスフェクションしたものを用いた。

結果を図18に示す。図18の(A)はp2y9が導入された細胞の膜を用いた場合であり、図18の(B)は陰性対照の場合である。図18の各グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの濃度(nM)であり、縦軸は測定された放射能の量(dpm)である。各グラフの黒四角印(■)は総結合量を示し、黒菱形印(◆)は非特異的結合量を示す。白丸印(○)は、総結合量から非特異的結合量を引いて求めた特異的結合量を示す。

これらの結果から得られた動力学パラメーターを求めるためのグラフを図19に示す。トリチウムラベルされたLPAの比活性は2109GBq/mmol(57Ci/mmol)であった。図19の横軸は結合(fmol/mg)を示し、縦軸は結合と解離の比(fmol/mg/nM)を示す。この結果得られた直線の式は、

$$y = -0.0223x + 831.19$$

であった。

この結果、p2y9とLPAとのKd値は、44.8nMであり、Bmaxは

37. 3 pmol/mgタンパク質であった。また、

【0021】

さらに、PC12細胞を用いてp2y9の作用を検討した。

PC12細胞に、以下の(1)～(3)の3種のDNAを同時にトランスフェクションした。

(1) pCXN2.1ベクターに挿入されたHAタグ付きのp2y9をコードするDNA。

(2) ラットのzifプロモーターに発現が制御されたホタルのルシフェラーゼDNA。zifプロモーターは細胞外からの刺激に応じて活性化する。

(3) 単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターに発現が制御されたウミシイタケのルシフェラーゼDNA。チミジンキナーゼプロモーターは外来の刺激に関係なく、常に一定の活性を持つ。

得られたトランスフェクタントに、種々の濃度のLPAで細胞を6時間刺激したときのホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を求め、これらの値をもとにウミシイタケルシフェラーゼに対するホタルのルシフェラーゼ活性値の比を算出した。陰性対照サンプルでは、p2y9をコードするDNAの代わりにpCXN2.1ベクターをトランスフェクションしたものを用いた。

結果を図20に示す。図20の横軸はLPAの濃度(nM～μM)を示し、縦軸は比を示す。黒四角印(■)はp2y9を導入したPC12細胞の場合を示し、黒菱形印(◆)は陰性対照の場合を示す。

zifプロモーターやチミジンキナーゼプロモーターは、細胞内のcAMPの濃度の上昇やカルシウムの濃度の上昇により作動するプロモーターであり、この結果、p2y9は、PC12細胞においてもLPAに対して濃度依存的に反応していることがわかった。また、この結果からすれば、PC12細胞はLPA受容体を元々は持っていないか、持っているとしてもかなり感受性の低い受容体であることも示された。

【0022】

以上のことから、p2y9はLPAの受容体であることが明確になった。p2y9は図1のGPCRの系統樹からも明らかなように、従来LPAの受容体とし

て知られていたEDGファミリーやPSP24とは相同性のないものであり、本発明は全く新しいタイプのLPAの受容体を提供するものである。また、従来PAF受容体と相同性があるp2y9が、PAFとは相違しているLPAの受容体として機能しているという本発明の知見は、GPCRの系統樹に対する新たな知見を提供するものでもある。

### 【0023】

本発明は、p2y9がLPAの受容体であるという、p2y9の新たな機能及び用途を提供するものである。

本発明のp2y9としては、ヒト型のもの、マウス型のものなどp2y9として機能するものであればよく、好ましいp2y9としては配列表の配列番号1に記載されたアミノ酸配列を有するものが挙げられる。このアミノ酸配列は、この全配列に限定されるものではなく、その一部のアミノ酸が欠失し、また一部のアミノ酸が他のアミノ酸で置換され、また他のアミノ酸が付加され、又はこれらが同時に組み合わされたアミノ酸配列を有するものであってもp2y9としての機能を有するものであればよい。

本発明のLPAとしては、前記の実験で使用されてきた1-オレオイル-LPAに限定されるものではなく、グリセリンの3位の水酸基にリン酸基が結合し、1位又は2位のいずれかの水酸基にアシル基、アルケニル基、アルキル基などが結合したものであればよく、これらの誘導体であってもよく、p2y9に対する反応性を有するLPAであればよい。

本発明においては、グリセリンの1位にアシル基が結合したLPAを1-アシル-LPAと称し、グリセリンの2位にアシル基が結合したLPAを2-アシル-LPAと称する。同様に、アルケニル基の場合には1-アルケニル-LPA、2-アルケニル-LPAと称し、アルキル基の場合には、1-アルキル-LPA、2-アルキル-LPAと称する。グリセリンに結合するアシル基としては、例えば、飽和又は不飽和の脂肪酸から誘導されるアシル基が好ましく、具体的にはパルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、オレイン酸、アラキドン酸などから誘導されるアシル基が挙げられる。アルケニル基としては、例えば、炭素数10～30、好ましくは炭素数14～22の直鎖状又は分枝状、好ましくは直鎖状の

アルケニル基が挙げられ、当該アルケニル基は1個以上、好ましくは1個の不飽和結合を有するものが挙げられる。アルケニル基の例としては、1-ヘキサデセニル基、1-オクタデセニル基などが挙げられる。アルキル基としては、例えば炭素数10~30、好ましくは炭素数14~22の直鎖状又は分枝状、好ましくは直鎖状のアルキル基が挙げられる。アルキル基の例としては、ヘキサデシル基、オクタデシル基などが挙げられる。

#### 【0024】

本発明は、p2y9がLPAの受容体であることから、LPAによって亢進又は抑制される各種の生理活性を、本発明のp2y9を用いてスクリーニングすることができる。本発明のスクリーニング方法は、p2y9を細胞に発現させて行ってもよいし、既にp2y9を有する細胞を用いてもよいし、またp2y9を有する膜を使用してもよい。本発明のスクリーニング方法は、前記で例示したいずれの方法に限定されるものではないが、いずれの方法においても、p2y9をLPAの受容体として、LPAに対する活性物質をスクリーニングする方法を包含するものである。

#### 【0025】

##### 【実施例】

次に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【0026】

##### 実施例1 (CHO細胞への受容体の導入)

N末端に9アミノ酸残基からなるHAタグを付加したGPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種のオーファン受容体をコードするDNAをそれぞれpCXN2.1ベクター(図2参照)に組み込み、インビトロジェン社のリポフェクトアミンプラスでCHO細胞にトランスフェクションした。培養は10%ウシ胎児血清を含むHamF-12培地を用いた。2g/Lのネオマイシン存在下で1個のCHO細胞由来の細胞群(クローン)を増殖させた後、細胞表面上のHAタグの発現レベルが高いクローンをフローサイトメトリー解析で複数選択し、それぞれの受容体の安定的発現クローンを得た。

## 【0027】

実施例2 (種々の脂質に対する各クローンのカルシウム濃度の変化の測定)

GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の各受容体のCHOクローン1つずつについて、1ウェル当たり $4 \times 10^4$ 個の細胞を96穴プレート3枚に播いた。翌日、 $4 \mu\text{M}$ のフルオ3 (カルシウムインジケーター) と $37^\circ\text{C}$ で1時間保温し、細胞内にフルオ3を取り込ませた。その後、約200種類の脂質分子から構成されているバイオモル社の脂質ライブラリーの各脂質 ( $1 \sim 10 \mu\text{M}$ ) やATP等の17種類のヌクレオチド類 ( $1 \sim 100 \mu\text{M}$ ) と反応させ、モレキュラーデバイス社のフレックスステーションを用いて細胞内カルシウム濃度の時間変化を追った。

CHO細胞はもともとATP受容体を発現しているので、ATPを添加したクローンでは振り切れる程大きな細胞内カルシウム濃度の変化が認められた。これにより、この実験の正当性を確認することができた。

一方、ATPのような全てのクローンにおいてではなく、発現している受容体特異的な細胞内カルシウム上昇は、p2y9を発現したクローンがLPAと反応したときに認められた。

## 【0028】

実施例3 (LPAに対する各クローンのカルシウム濃度の変化の測定)

GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体各々を安定的に発現しているCHOクローンの細胞を用いて、実施例2に記載の方法と同様にして、各細胞内のカルシウムの濃度の変化を測定した。

結果を図3に示す。

## 【0029】

実施例4 (各クローンによるcAMPの濃度の変化の測定)

GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体各々を安定的に発現しているCHOクローンの細胞を、 $5 \text{ mM}$  HEPES- $\text{NaOH}$  ( $\text{pH}$  7.4)、 $0.1\%$  BSA、 $500 \mu\text{M}$  IBMX (cAMP分解酵素阻害剤) を含むHBSSに懸濁した。 $1 \times 10^5$ 個ずつの細胞を384穴プレートに播き、 $50 \mu\text{M}$ フォルスコリン (受容体非依存的にcAMP合成酵素を活性化

する薬剤)の共存下で、上記バイオモル社の脂質ライブラリーの中からの59種類または17種類のヌクレオチド類と室温で30分間反応させた。その後、細胞内サイクリックAMP (cAMP)濃度をパッカー社のアルファースクリーン cAMP アッセイキットを使って測定した。

結果を図4～図10に示す。

p2y9を発現しているCHO細胞がLPAに反応したときに、大きなcAMP濃度の上昇が認められた(図8参照)。

### 【0030】

#### 実施例5 (p2y9のクローンの比較)

p2y9を安定的に発現しているCHOクローン、#01、#09、#15、及び#20の4種について、10%ウシ胎児血清を含むHamF-12から0.1%BSAを含むHamF-12に培地を切り替え24時間培養した。その後3 $\mu$ Mフラ2(カルシウムインジケーター)と0.01%クレモフォアELを含むHEPES-タイロード緩衝液(140mM NaCl、2.7mM KCl、1mM CaCl<sub>2</sub>、12mM NaHCO<sub>3</sub>、5.6mM D-グルコース、0.49mM MgCl<sub>2</sub>、0.37mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、25mM HEPES-NaOH(pH 7.4))で細胞を懸濁した。これを37℃で1時間保温し、細胞内にフラ2を取り込ませた。1 $\times$ 10<sup>6</sup>個/mlの濃度になるよう再びHEPES-タイロード緩衝液に細胞を懸濁し、種々の濃度のLPAを加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を、日本光電社製のCAF-100を用いて測定した。陰性対照サンプルとして、pCXN2.1ベクターのみをトランスフェクションしてネオマイシン耐性を獲得したCHO細胞を用いた。

結果を図11に示す。

### 【0031】

#### 実施例6 (p2y9の各クローンによるトロンビン等に対する反応性)

p2y9を安定的に発現しているCHOクローン、#01、#09、#15、及び#20の4種を用いて、LPAに代えて、トロンビン0.1NIH単位/ml、PAF1 $\mu$ M、ATP10 $\mu$ Mをそれぞれ添加して、実施例5と同様にして各クローンの細胞内のカルシウム濃度の増加を測定した。

結果を図12に示す。トロンビン、PAF、及びATPのいずれの場合も、陰性対照と比べて大きな相違は見られなかった。

### 【0032】

実施例7 (p2y9のクローンとp2y5のクローンの比較)

10%ウシ胎児血清の代わりに、0.1%BSAを含むHamF-12培地で24時間培養したp2y9またはp2y5を安定的に発現しているCHOクローン1つずつを、5mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、0.1%BSA、500 $\mu$ M IBMXを含むHBSSに懸濁した。5 $\mu$ Mフォルスコリンで処理する場合は、 $1 \times 10^5$ 個ずつ、処理しない場合は $1 \times 10^6$ 個ずつを384穴プレートに播いた。その後、種々の濃度のLPAを加えて室温で30分間処理したときの細胞内cAMP濃度を、パッカー社のアルファースクリーンcAMPアッセイキットを使って測定した。陰性対照サンプルとして、pCXN2.1ベクターのみをトランスフェクションしてネオマイシン耐性を獲得したCHO細胞を用いた。

結果を図13に示す。

### 【0033】

実施例8 (RH7777細胞またはB103細胞によるp2y9及びp2y5の発現と、LPAに対する反応性)

pCXN2.1ベクターに挿入されたHAタグ付きのp2y9またはp2y5をコードするDNAをインビトロジェン社のリポフェクトアミン2000によって、RH7777細胞またはB103細胞へトランスフェクションした。24時間後に10%ウシ胎児血清を含むDMEMから、0.1%BSAを含むDMEMに培地を切り替え、さらに24時間培養した。細胞を剥がし取り、結合バッファー(25mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、10mM MgCl<sub>2</sub>、0.25Mシュクロース)に懸濁した状態で、金属プローブを用いた超音波処理によって細胞を破碎し、800 x gで遠心分離し、上清をさらに100,000 x gの超遠心分離にかけて、沈殿を得た。この沈殿を再び結合バッファーに懸濁し、一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分とした。

50 $\mu$ gのタンパク質を含む膜画分を、0.25%BSAを含む結合バッファ

一中で、各濃度でのLPAの総結合量を求めるために、1 nM、3 nM、及び10 nMのトリチウムラベルされたLPAと混ぜ合わせ（計200  $\mu$ l）、4℃で60分間反応させた。これと平行して、各濃度でのLPAの非特異的結合量を求めるために、500倍濃度のトリチウムラベルされていないLPAを含んだ反応液で、膜画分とトリチウムラベルされたLPAを同様に反応させた。

反応液をバッカード社のGF/Cガラスフィルターで濾過し、さらにこれを0.25%BSAを含む結合バッファーで洗浄した。洗浄後にも依然としてガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされたLPAの量とした。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を引いて求めた。陰性対照サンプルでは、受容体をコードするDNAの代わりにpCXN2.1ベクターをトランスフェクションした。

RH7777細胞についての結果を図15に示し、B103細胞についての結果を図16に示す。

#### 【0034】

##### 実施例9

pCXN2.1ベクターに挿入されたHAタグ付きのp2y9またはp2y5をコードするDNAをインビトロジェン社のリポフェクトアミン2000によって、RH7777細胞へトランスフェクションした。24時間後に10%ウシ胎児血清を含むDMEMから、0.1%BSAを含むDMEMに培地を切り替え、さらに24時間培養した。細胞を剥がし取り、結合バッファー（25mM HEPES-NaOH（pH 7.4）、10mM MgCl<sub>2</sub>、0.25M シュウクロース）に懸濁した状態で、金属プローブを用いた超音波処理によって細胞を破碎し、800 x gで遠心分離し、上清をさらに100,000 x gの超遠心分離にかけて、沈殿を得た。この沈殿を再び結合バッファーに懸濁し、一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分とした。

20  $\mu$ gのタンパク質を含む膜画分を、0.25%BSAを含む結合バッファー一中で、LPAの総結合量を求めるために、5 nMのトリチウムラベルされたLPAと混ぜ合わせ（計200  $\mu$ l）、4℃で60分間反応させた（この結果を、図17中では“Buffer”と記載している。）。これと平行して、5 nMの



トリチウムラベルされたLPAと、 $1\mu\text{M}$ のトリチウムラベルされていない種々の脂質（LPC：リゾフォスファチジルコリン、LPE：リゾフォスファチジルエタノールアミン、LPS：リゾフォスファチジルセリン、LPG：リゾフォスファチジルグリセロール、PA：フォスファチジン酸、PAF：血小板活性化因子、S1P：スフィンゴシン1-リン酸、SPC：シフィンゴシルフォスホリルコリン）を含む反応液で、膜画分とトリチウムラベルされたLPAを同様に反応させた。

各反応液をパッカー社（Packer）のGF/Cガラスフィルターで濾過し、さらにこれを0.25%BSAを含む結合バッファーで洗浄した。洗浄後にも依然としてガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされたLPAの量とした。

結果を図17に示す。添加した脂質がp2y9に親和性を有していれば、p2y9にLPAと競争的に結合し、その結果LPAのp2y9への結合が阻害され、トリチウムラベルされたLPAの結合量が減少することになるが、実験の結果は図17に示されるように、LPA以外の調べた脂質は全てp2y9への親和性がLPAほど高くないことが示された。

#### 【0035】

実施例10 （p2y9に対するLPAの結合の動力学的考察）

pCXN2.1ベクターに挿入されたHAタグ付きのp2y9をコードするDNAをインビトロジェン社のリポフェクトアミン2000によって、RH777細胞へトランスフェクションした。24時間後に10%ウシ胎児血清を含むDMEMから、0.1%BSAを含むDMEMに培地を切り替え、さらに24時間培養した。細胞を剥がし取り、結合バッファー（25mM HEPES-NaOH（pH 7.4）、10mM  $\text{MgCl}_2$ 、0.25M シュウクロース）に懸濁した状態で、金属プローブを用いた超音波処理によって細胞を破碎し、 $800\times g$ で遠心分離し、上清をさらに100,000 $\times g$ の超遠心分離にかけて、沈殿を得た。この沈殿を再び結合バッファーに懸濁し、一過性に受容体を発現する細胞由来の膜画分とした。

$40\mu\text{g}$ のタンパク質を含む膜画分を、種々の濃度でのLPAの総結合量を求

めるために、0.25% BSAを含む結合バッファー中で種々の濃度のトリチウムラベルされたLPAと混ぜ合わせ(計200 $\mu$ l)、4℃で60分間反応させた。これと平行して、種々の濃度でのLPAの非特異的結合量を求めるために、10 $\mu$ MのトリチウムラベルされていないLPAを含んだ反応液で、膜画分とトリチウムラベルされたLPAを同様に反応させた。

反応液をパッカー社(GF/C)ガラスフィルターで濾過し、さらにこれを0.25% BSAを含む結合バッファーで洗浄した。洗浄後にも依然としてガラスフィルターに吸着している放射能を、受容体と結合しているトリチウムラベルされたLPAの量とした。特異的結合量は総結合量から非特異的結合量を引いて求めた。陰性対照サンプルでは、受容体をコードするDNAの代わりにpCXN2.1ベクターをトランスフェクションした。

結果を図18に示す。さらに、p2y9に対するLPAの結合をまとめたグラフを図19に示す。トリチウムラベルされたLPAの比活性は2109 GBq/mmol (57 Ci/mmol)であった。この図に示されるように、結果はほぼ直線上に乗り、当該直線の式は、 $y = -0.0223x + 831.19$ であった。

この結果、p2y9とLPAとの $K_d$ 値は、44.8 nMであり、 $B_{max}$ は37.3 pmol/mgタンパク質であった。また、

【0036】

実施例11 (PC12細胞によるルシフェラーゼ分析)

10%ウマ血清と5%ウシ胎児血清を含むDMEM培地から、0.5%ウマ血清と0.25%ウシ胎児血清を含むDMEM培地に交換したPC12細胞に対し、以下の3種のDNAを同時にトランスフェクションした。

(1) pCXN2.1ベクターに挿入されたHAタグ付きのp2y9をコードするDNA。

(2) ラットのzifプロモーターに発現が制御されたホタルのルシフェラーゼDNA。

(3) 単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモーターに発現が制御されたウミシイタケのルシフェラーゼDNA。

トランスフェクションの試薬はキアゲン社のスーパーフェクトを用いた。2 x 10<sup>5</sup> 個ずつの細胞を 24 穴プレートに播き、48 時間培養した。その後、培地を 0.1% BSA を含む DMEM 培地に交換し、さらに 12 時間培養した。

種々の濃度の LPA で細胞を 6 時間刺激したときのホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を、東洋インキ社のピッカジーンデュアルシーパンジーキットとベルトールド社のルミノメーター LB9506 によって求め、これらの値をもとにウミシイタケに対するホタルのルシフェラーゼ活性値の比を算出した。陰性対照サンプルでは、p2y9 をコードする DNA の代わりに pCXN2.1 ベクターをトランスフェクションした。

結果を図 20 に示す。

### 【0037】

#### 【発明の効果】

リゾホスファチジン酸 (lysophosphatidic acid: LPA) は、血小板活性化因子 (PAF) やスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) などと共に「リゾリン脂質メディエーター」の 1 種であると考えられており、細胞増殖促進作用、神経細胞の成熟化に必要な神経突起を退縮させる作用、癌細胞の浸潤を誘導する作用、平滑筋収縮作用、血小板凝集作用、細胞死の抑制、細胞の走化性の亢進作用など、様々な組織において様々な作用を有していることが知られてきている。しかし、その作用機構や受容体については、十分な解明がされていなかった。LPA の生体内での作用機構を解明することは、LPA が関与している様々な生理作用についての障害を治癒するために必要であり、LPA の作用機構の解明が求められていた。

本発明は、LPA の新しいタイプの受容体を明らかにするものであり、LPA の受容体を解明したことにより、LPA の関与する様々な生理作用についての新しい医薬品や診断薬の開発に有効なスクリーニング手法を提供するものである。また、本発明により明らかにされた LPA 受容体である p2y9 は、LPA の受容体として従来から知られていた EDG ファミリーや PSP24 とはアミノ酸配列の相同性がほとんど無いものであり、LPA の幅広い生理作用の解明に新たな分野を提供するものである。

【0038】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Japan Science and Technology Corporation

&lt;120&gt; A novel lysophosphatidic acid receptor

&lt;130&gt; PA903379-shi

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 370

&lt;212&gt; PRN

&lt;213&gt; human

&lt;400&gt; 1

Met Gly Asp Arg Arg Phe Ile Asp Phe Gln Phe Gln Asp Ser Asn Ser  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Pro Arg Leu Gly Asn Ala Thr Ala Asn Asn Thr Cys Ile  
20 25 30

Val Asp Asp Ser Phe Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Ala Val Tyr Ser Val  
35 40 45

Val Phe Ile Leu Gly Leu Ile Thr Asn Ser Val Ser Leu Phe Val Phe  
50 55 60

Cys Phe Arg Met Lys Met Arg Ser Glu Thr Ala Ile Phe Ile Thr Asn  
65 70 75 80

Leu Ala Val Ser Asp Leu Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Phe Lys Ile  
85 90 95

Phe Tyr Asn Phe Asn Arg His Trp Pro Phe Gly Asp Thr Leu Cys Lys  
100 105 110

Ile Ser Gly Thr Ala Phe Leu Thr Asn Ile Tyr Gly Ser Met Leu Phe  
115 120 125

Leu Thr Cys Ile Ser Val Asp Arg Phe Leu Ala Ile Val Tyr Pro Phe  
130 135 140

Arg Ser Arg Thr Ile Arg Thr Arg Arg Asn Ser Ala Ile Val Cys Ala  
145 150 155 160

Gly Val Trp Ile Leu Val Leu Ser Gly Gly Ile Ser Ala Ser Leu Phe  
165 170 175

Ser Thr Thr Asn Val Asn Asn Ala Thr Thr Thr Cys Phe Glu Gly Phe  
180 185 190

Ser Lys Arg Val Trp Lys Thr Tyr Leu Ser Lys Ile Thr Ile Phe Ile

195	200	205
Glu Val Val Gly Phe Ile Ile Pro Leu Ile Leu Asn Val Ser Cys Ser		
210	215	220
Ser Val Val Leu Arg Thr Leu Arg Lys Pro Ala Thr Leu Ser Gln Ile		
225	230	235 240
Gly Thr Asn Lys Lys Lys Val Leu Lys Met Ile Thr Val His Met Ala		
245	250	255
Val Phe Val Val Cys Phe Val Pro Tyr Asn Ser Val Leu Phe Leu Tyr		
260	265	270
Ala Leu Val Arg Ser Gln Ala Ile Thr Asn Cys Phe Leu Glu Arg Phe		
275	280	285
Ala Lys Ile Met Tyr Pro Ile Thr Leu Cys Leu Ala Thr Leu Asn Cys		
290	295	300
Cys Phe Asp Pro Phe Ile Tyr Tyr Phe Thr Leu Glu Ser Phe Gln Lys		
305	310	315 320
Ser Phe Tyr Ile Asn Ala His Ile Arg Met Glu Ser Leu Phe Lys Thr		
325	330	335
Glu Thr Pro Leu Thr Thr Lys Pro Ser Leu Pro Ala Ile Gln Glu Glu		
340	345	350

Val Ser Asp Gln Thr Thr Asn Asn Gly Gly Glu Leu Met Leu Glu Ser  
 355 360 365

Thr Phe  
 370

### 【図面の簡単な説明】

#### 【図 1】

図 1 は、GPCR の系統樹である。図 1 中の任意の 2 つの受容体を結ぶ線の長さの総和が小さい程、お互いが近縁であることを示す。

#### 【図 2】

図 2 は、本発明の p2y9 を細胞に導入するためのベクターの例を示す。図 2 の例は、HA タグの付いた p2y9 をコードする DNA を pCXN2.1 ベクターの KpnI と NheI の間に組み込んだ発現ベクターを示す。

#### 【図 3】

図 3 は、各受容体の CHO 細胞のクローンを用いて、10  $\mu$ M の LPA による各細胞のカルシウム濃度の変化を詳細に検討した結果を示す。図 3 の縦軸はカルシウム濃度 (RFU) を示し、横軸は時間 (秒) を示す。図 3 中の黒丸印 (●) は GPR34 の場合を示し、白四角印 (□) は p2y5 の場合を示し、白三角印 (△) は p2y9 の場合を示し、バツ印 (×) は p2y10 の場合をそれぞれ示している。

#### 【図 4】

図 4 は、GPR34、p2y5、p2y9、及び p2y10 の 4 種の受容体を各々安定的に発現している CHO クローンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリック AMP (cAMP) の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。図 4 の縦軸は cAMP の濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。図 4 の各添加物における 4 本の棒グラフは左から、GP

R34、p2y5、p2y9、及びp2y10をそれぞれ示している。

【図5】

図5は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。図5の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。図5の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10をそれぞれ示している。

【図6】

図6は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。図6の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。図6の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10をそれぞれ示している。

【図7】

図7は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。図7の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。図7の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10をそれぞれ示している。

【図8】

図8は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種の受容体を各々安定的に発現しているCHOクロンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結



果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。図8の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。図8の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10をそれぞれ示している。図8の左から5番目がLPAの場合である。

#### 【図9】

図9は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種を受容体を各々安定的に発現しているCHOクローンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。図9の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。図9の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10をそれぞれ示している。

#### 【図10】

図10は、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10の4種を受容体を各々安定的に発現しているCHOクローンの細胞を用いて、各種の脂質又はヌクレオチドの添加による細胞内のサイクリックAMP（cAMP）の濃度変化の結果を示すものである。使用した脂質類及びヌクレオチド類は図に記載のとおりである。図10の縦軸はcAMPの濃度を示し、横軸は使用した各脂質類又はヌクレオチド類を示している。図10の各添加物における4本の棒グラフは左から、GPR34、p2y5、p2y9、及びp2y10をそれぞれ示している。図10の右端はコントロールである。

#### 【図11】

図11は、p2y9を安定的に発現している4つのCHO細胞のクローン、#01、#09、#15、及び#20の各々について、種々の濃度のLPAを加えたときの細胞内カルシウム濃度の変化を測定した結果を示す。各グラフの横軸はLPAの濃度（nM）を示し、縦軸はカルシウムの増加量（nM）を示す。図11の（A）は#01のクローンの場合であり、図11の（B）は#09のクローンの場合であり、図11の（C）は#15のクローンの場合であり、図11の（

D) は# 20のクローンの場合である。各(A) ~ (D)の黒菱形印(◆)は各クローンの場合を示し、灰色の四角印(■)は陰性対照の場合を示す。

【図12】

図12は、CHO細胞のクローン、#01、#09、#15、及び#20の各々について、細胞内のカルシウム濃度の変化をトロンビン(0.1NIH単位/ml)、PAF(1 $\mu$ M)、及びATP(10 $\mu$ M)について検討した結果を示す。図12の縦軸はカルシウムの増加量(nM)を示し、横軸は各添加物を示す。各棒グラフは、左から陰性対照のベクターのみを導入したCHO細胞、p2y9のクローン#01、クローン#09、クローン#15、クローン#20をそれぞれ示している。

【図13】

図13は、p2y9またはp2y5を安定的に発現しているCHO細胞のクローンを用いて、百日咳毒素(PTX)の存在下又は非存在下で、種々の濃度のLPAを加えたときの細胞内cAMP濃度を測定した結果を示す。図13の(A)はフォルスコリン(5 $\mu$ M)で処理しなかった場合であり、図13の(B)はフォルスコリン(5 $\mu$ M)で処理した場合である。各図の横軸はLPAの濃度( $\mu$ M)を示し、縦軸はcAMPの濃度の変化の比を示す。各図の黒四角印(■)はp2y9のクローンの場合であり、灰色四角印(□)はp2y5のクローンの場合を示す。黒菱形印(◆)は陰性対照のベクターのみのクローンの場合を示す。各図の実線は、百日咳毒素(PTX)の非存在下の場合であり、破線は百日咳毒素(PTX)の存在下の場合である。

【図14】

図14は、本発明のp2y9とp2y5とのアミノ酸配列の相同性を示す。図14の上の段はp2y9であり、下の段はp2y5である。アミノ酸が同じ位置に有る場合には両者の間にアスタリスク(\*)が付されている。

【図15】

図15は、p2y5又は本発明のp2y9が導入されたRH7777細胞を用いて、LPAとの結合を測定した結果を示す。図15の(A)は陰性対照の場合を示し、(B)はp2y5の場合を示し、(C)はp2y9の場合を示す。グラ

フの横軸はトリチウムラベルされたLPAの添加量 (nM) であり、縦軸は測定された放射能の量 (dpm) を示す。各グラフの黒色の棒は総結合量であり、その右側の灰色の棒は非特異的結合量である。灰色三角印 (▲) は、特異的結合量を示している。

#### 【図16】

図16は、p2y5又は本発明のp2y9が導入されたB103細胞を用いて、LPAとの結合を測定した結果を示す。図16の(A)は陰性対照の場合を示し、(B)はp2y5の場合を示し、(C)はp2y9の場合を示す。グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの添加量 (nM) であり、縦軸は測定された放射能の量 (dpm) を示す。各グラフの黒色の棒は総結合量であり、その右側の灰色の棒は非特異的結合量である。灰色三角印 (▲) は、特異的結合量を示している。

#### 【図17】

図17は、RH7777細胞から得られた一過性にp2y9受容体を発現する細胞由来の膜画分を用いて、LPA以外の脂質との反応性を測定した結果を示すものである。図17中のBufferはトリチウムラベルされたLPAだけを用いた総結合量を示す対照である。図17の縦軸は測定された放射能の量 (dpm) を示し、横軸は添加した各脂質を示す。

#### 【図18】

図18は、本発明のp2y9を導入したRH7777細胞から得られた一過性にp2y9受容体を発現する細胞由来の膜画分を用いて、p2y9に対するLPAの結合の動力学的検討を行った結果を示すものである。図18の(A)はp2y9が導入された細胞の膜を用いた場合であり、図18の(B)は陰性対照の場合である。図18の各グラフの横軸はトリチウムラベルされたLPAの濃度 (nM) であり、縦軸は測定された放射能の量 (dpm) である。各グラフでは、総結合量を黒四角印 (■) で示し、非特異的結合量を黒菱形印 (◆) で示し、特異的結合量は白丸印 (○) で示されている。

#### 【図19】

図19は、図18の結果から得られた動力学パラメーターを求めるためのグラ

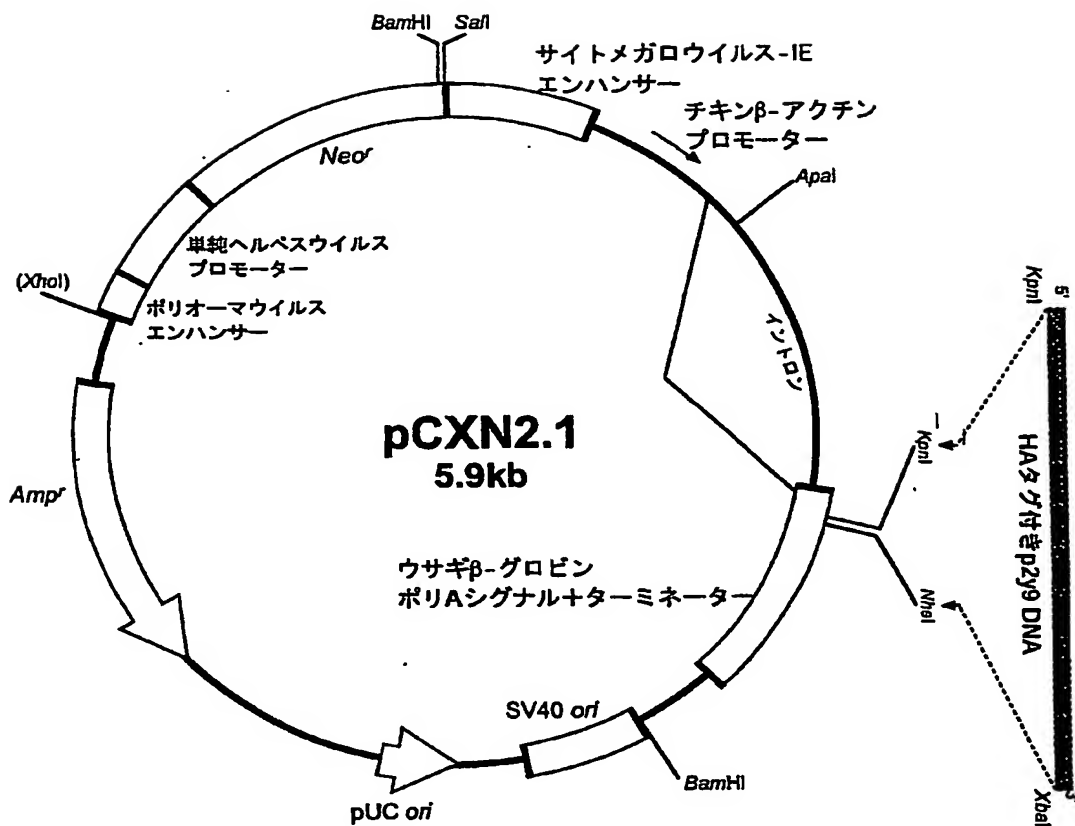
フを示す。図19の横軸は結合 ( $\text{fmol}/\text{mg}$ ) を示し、縦軸は結合と解離の比 ( $\text{fmol}/\text{mg}/\text{nM}$ ) を示す。

【図20】

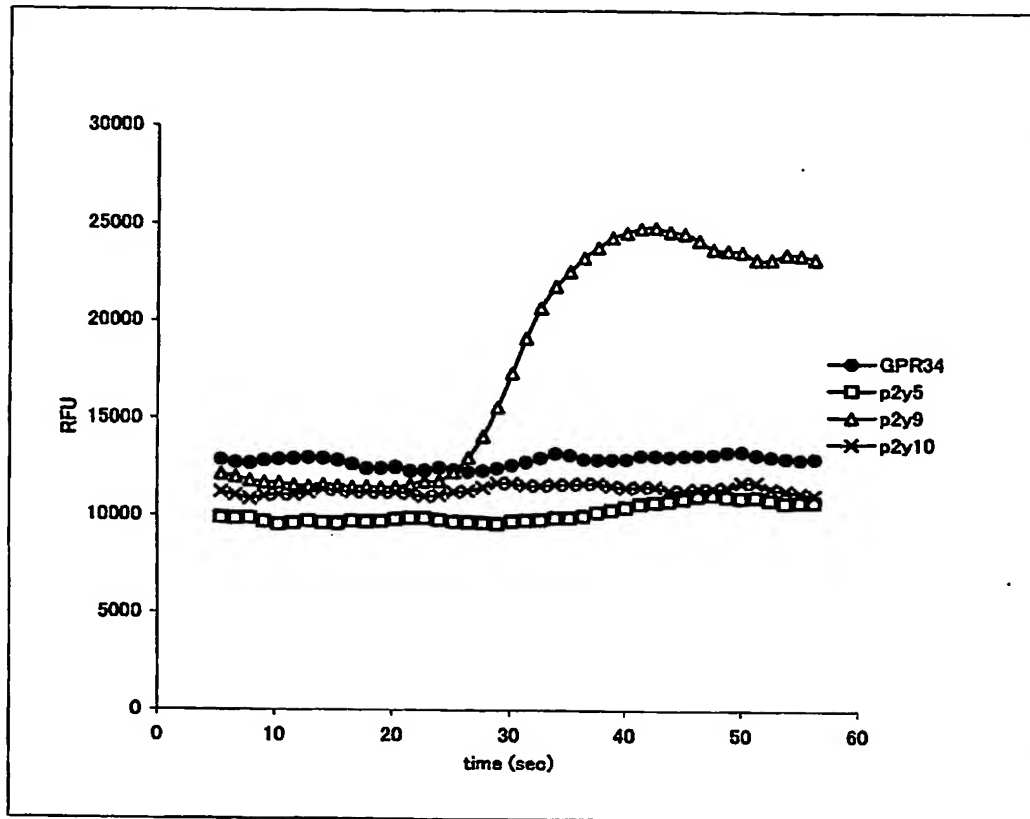
図20は、PC12細胞を用いてp2y9の作用をルシフェラーゼアッセイにより検討した結果を示すものである。図20の横軸はLPAの濃度 ( $\text{nM} \sim \mu\text{M}$ ) を示し、縦軸は比を示す。黒四角印 (■) はp2y9を導入したPC12細胞の場合を示し、黒菱形印 (◆) は陰性対照の場合を示す。



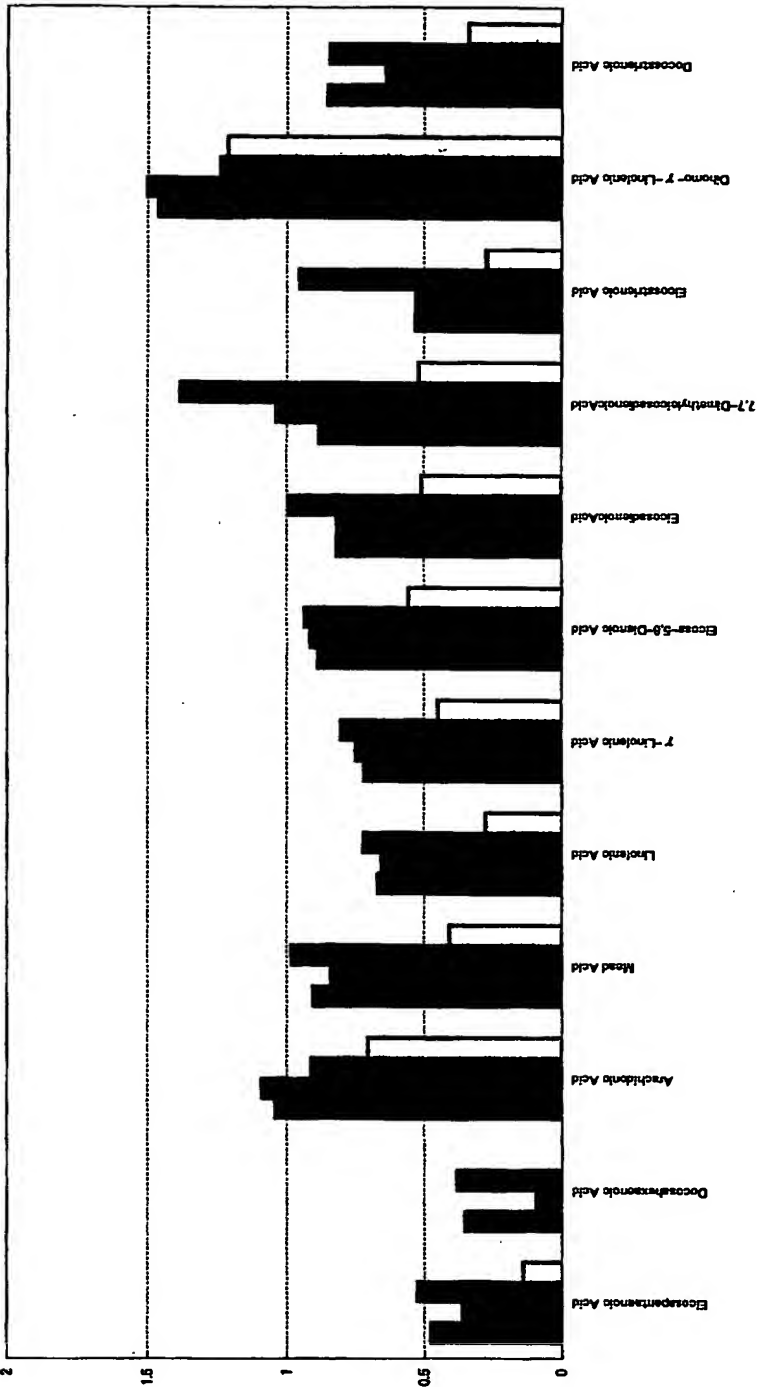
【図2】



【図 3】

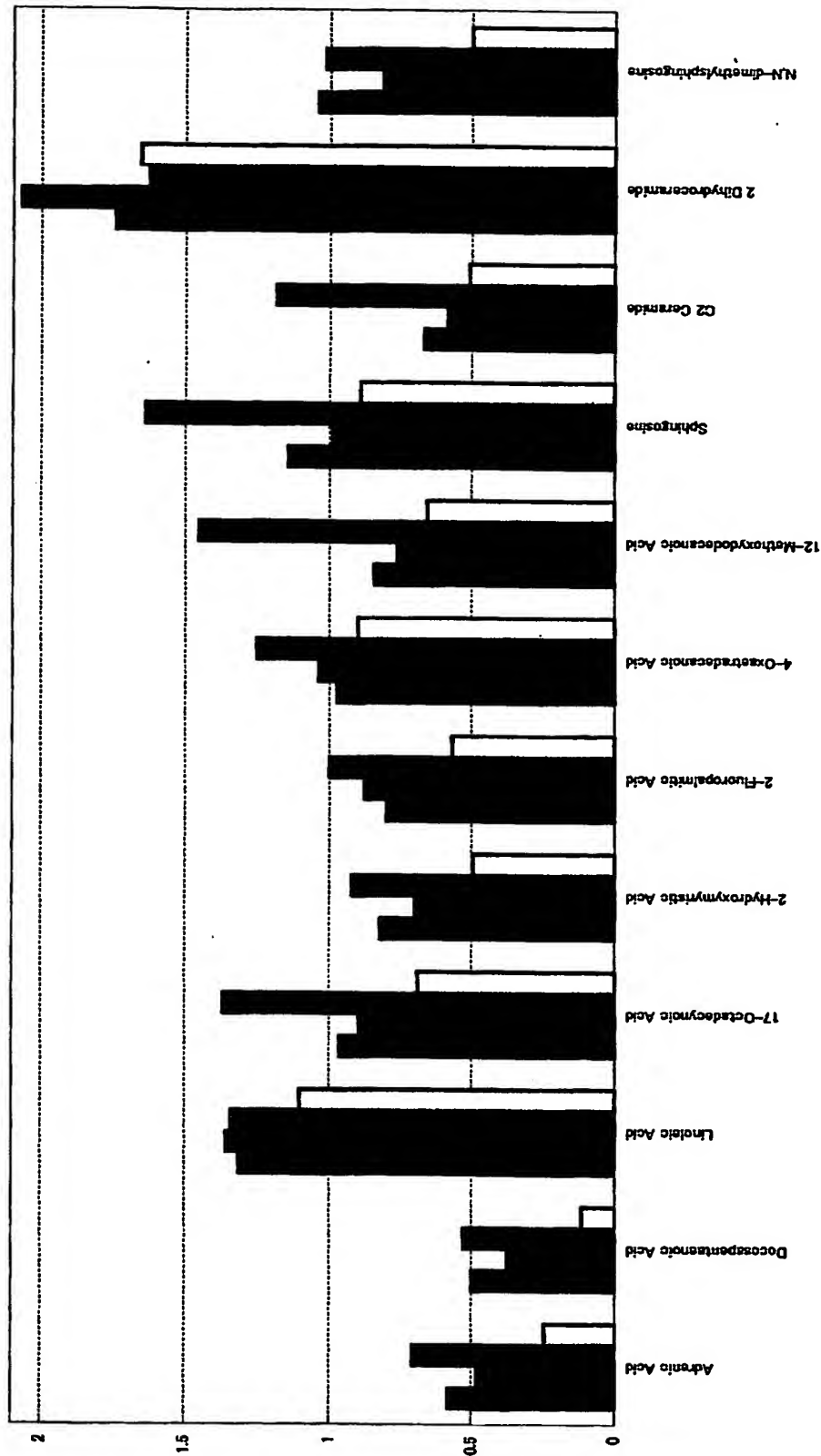


【図 4】

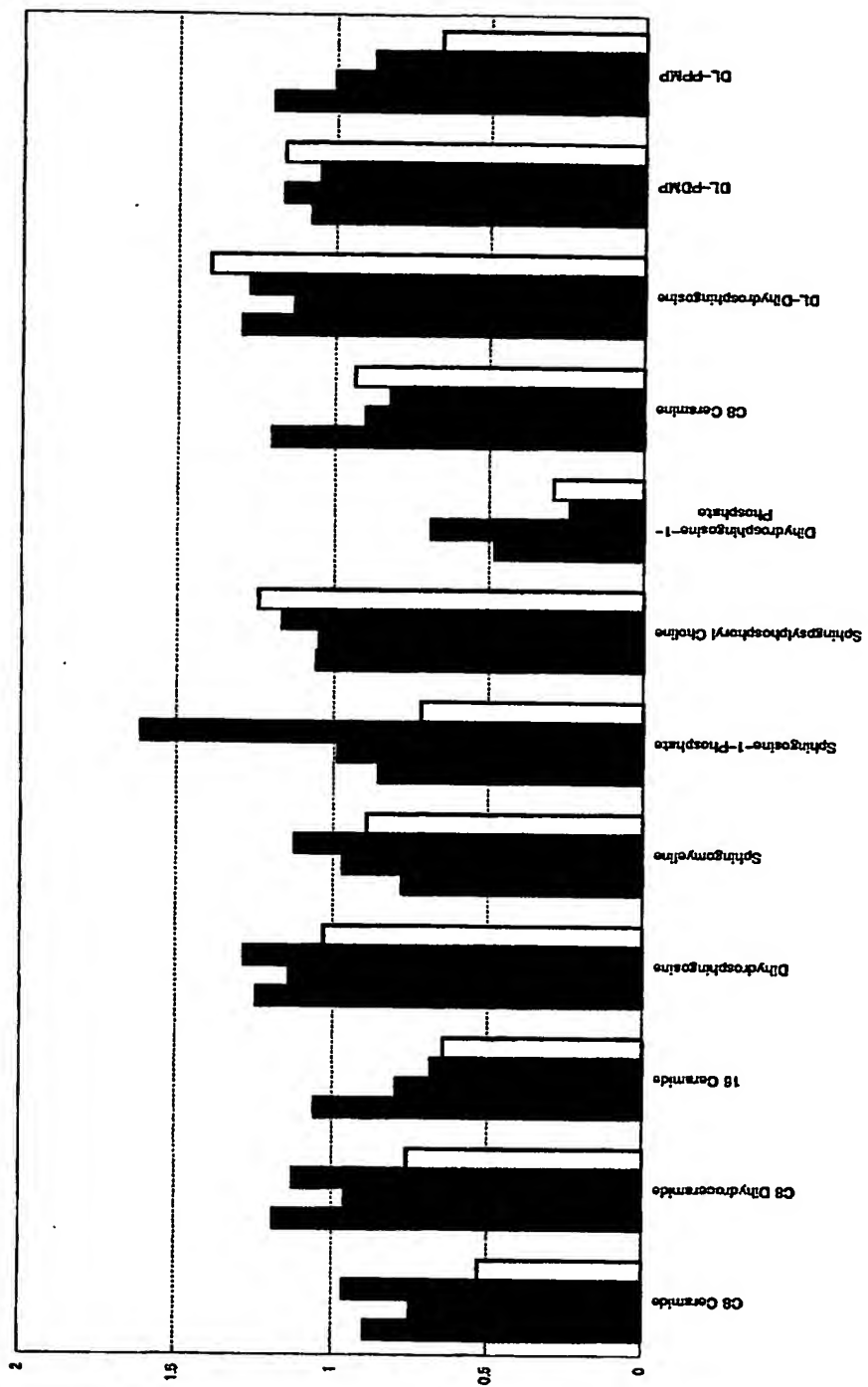


【図 5】

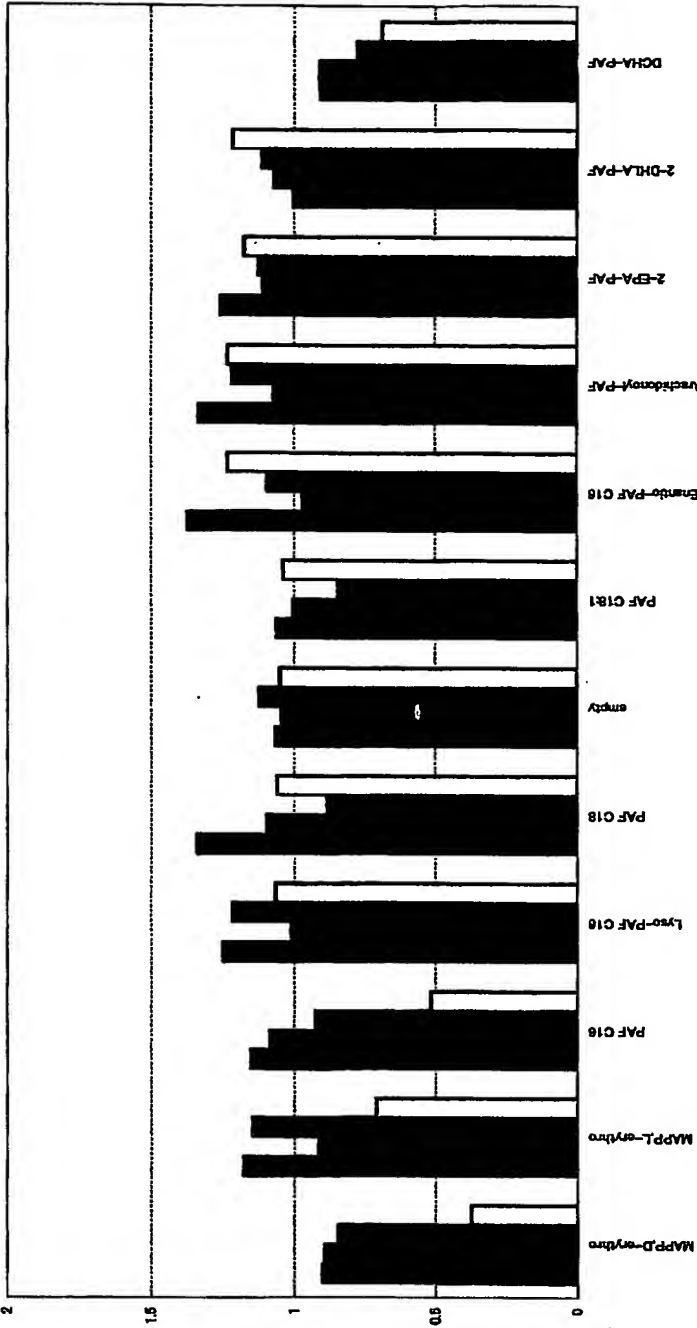




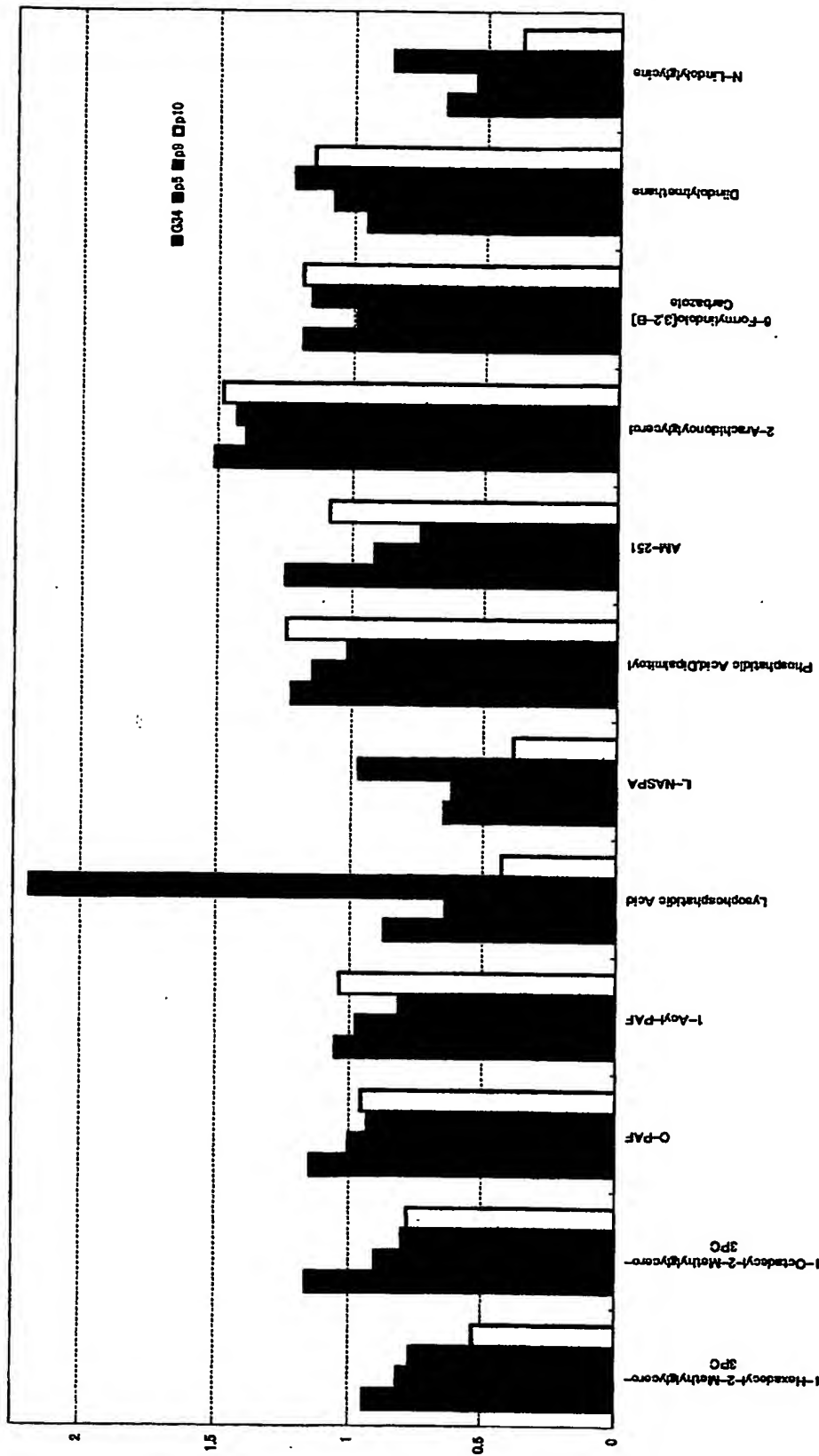
【図 6】




【図 7】

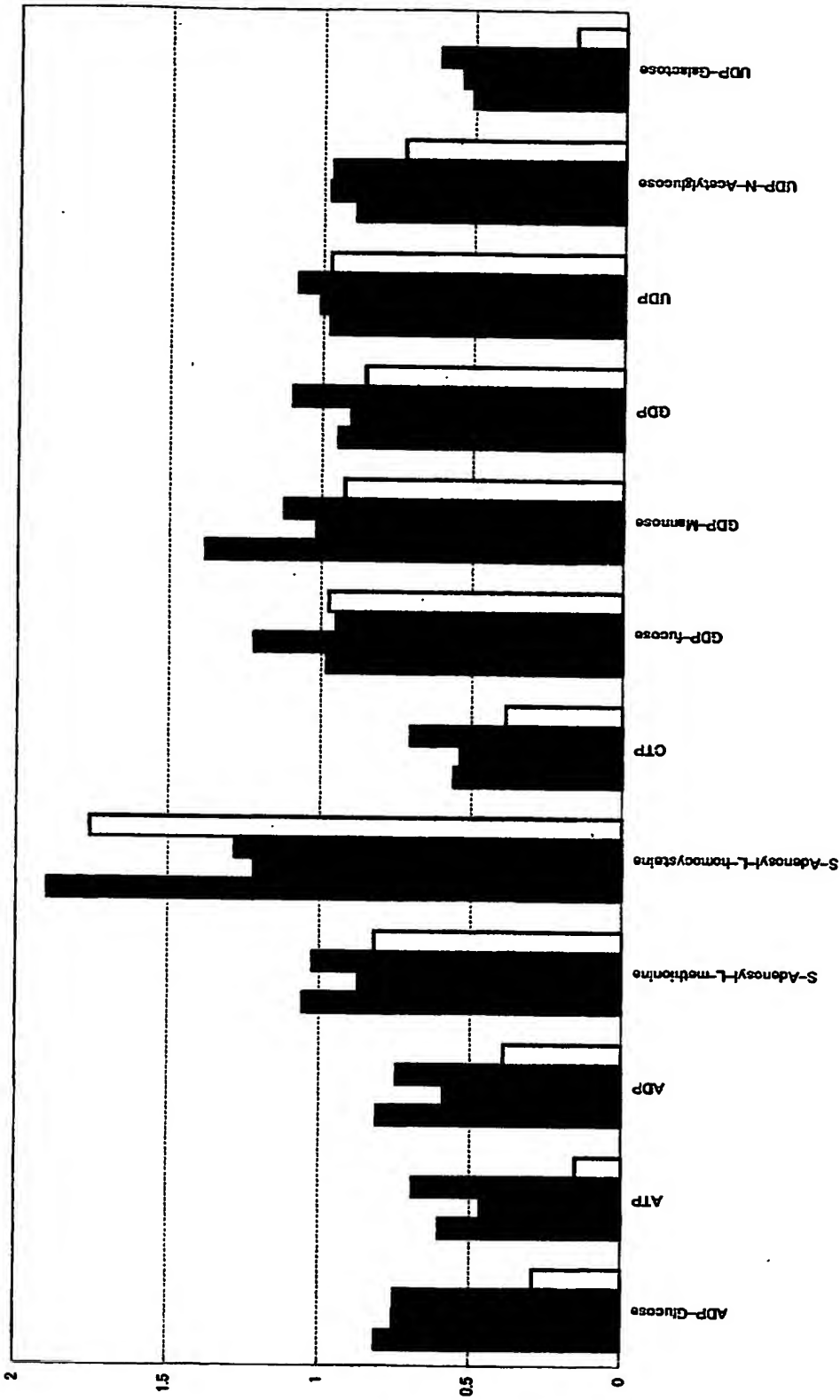


【図 8】

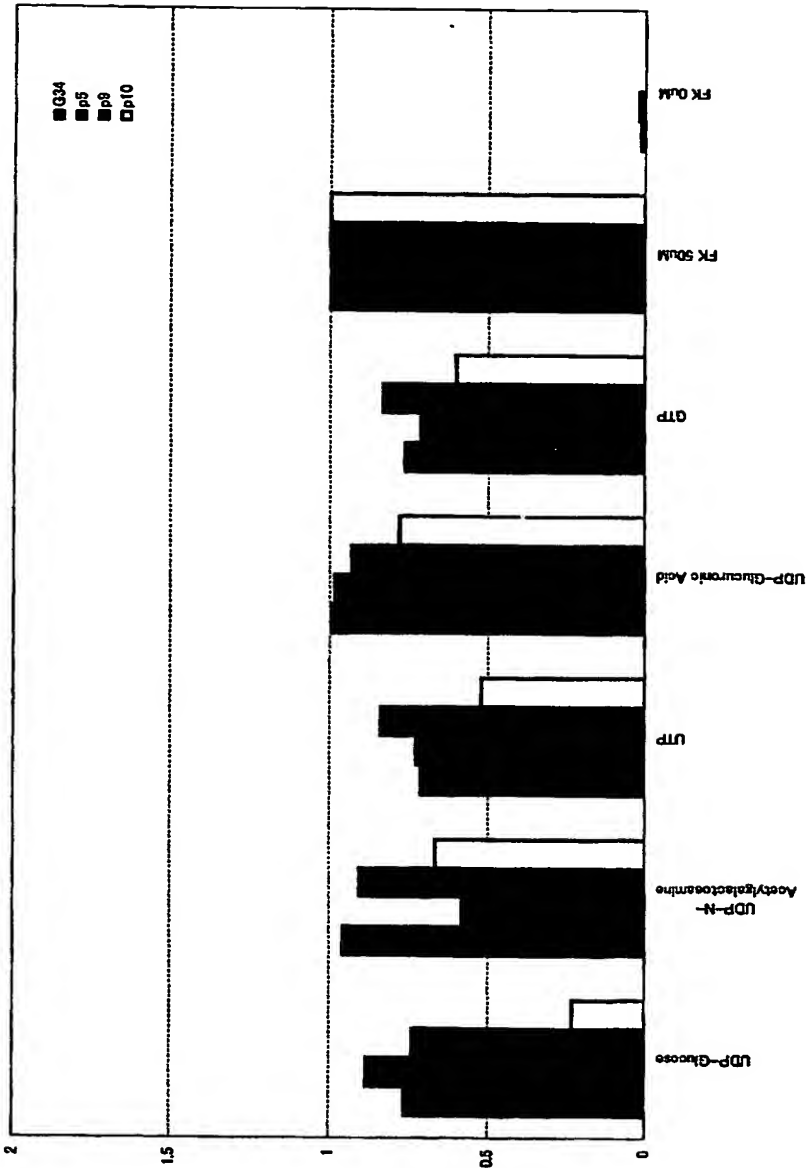




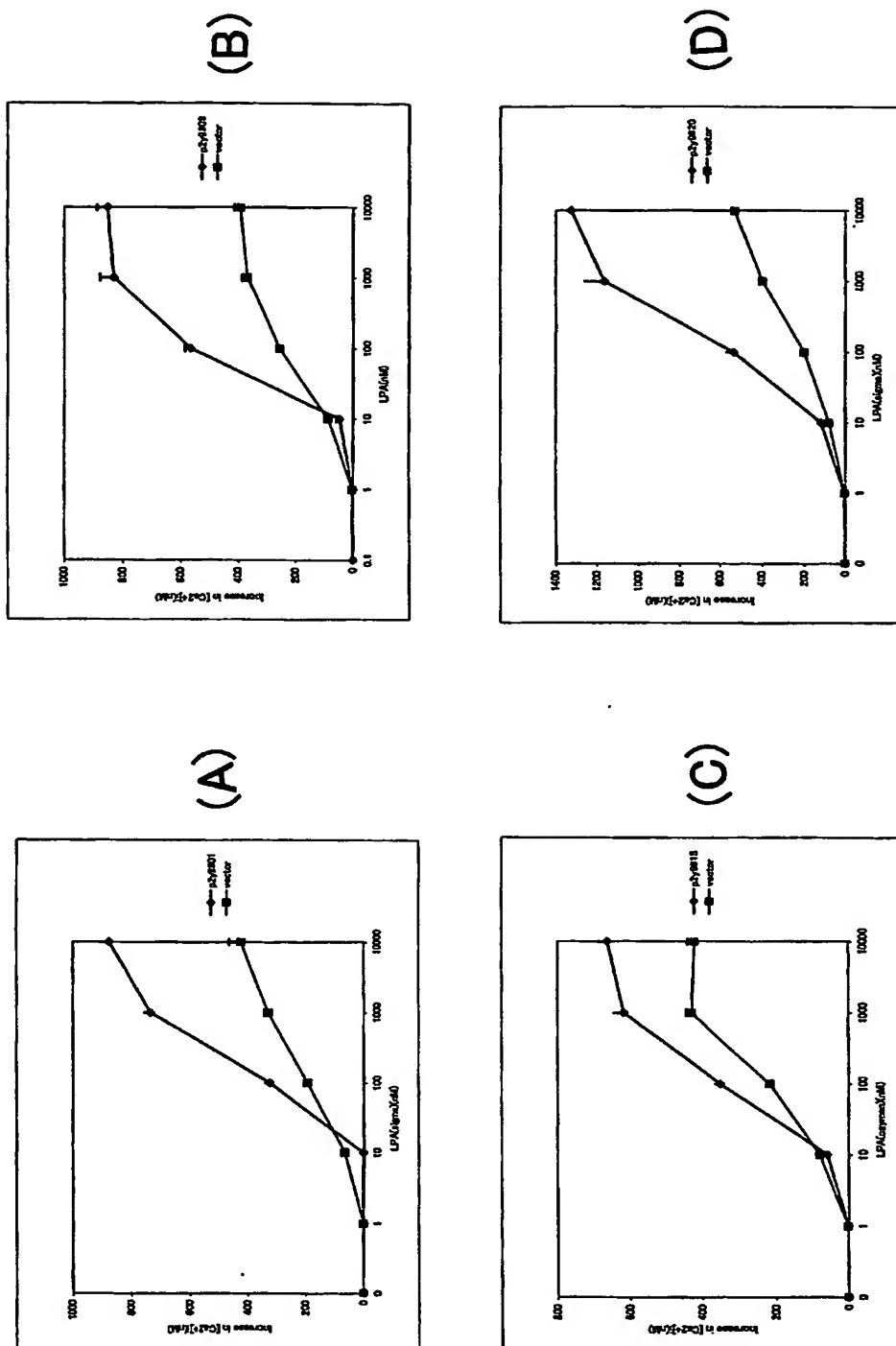
【図 9】



【図 10】

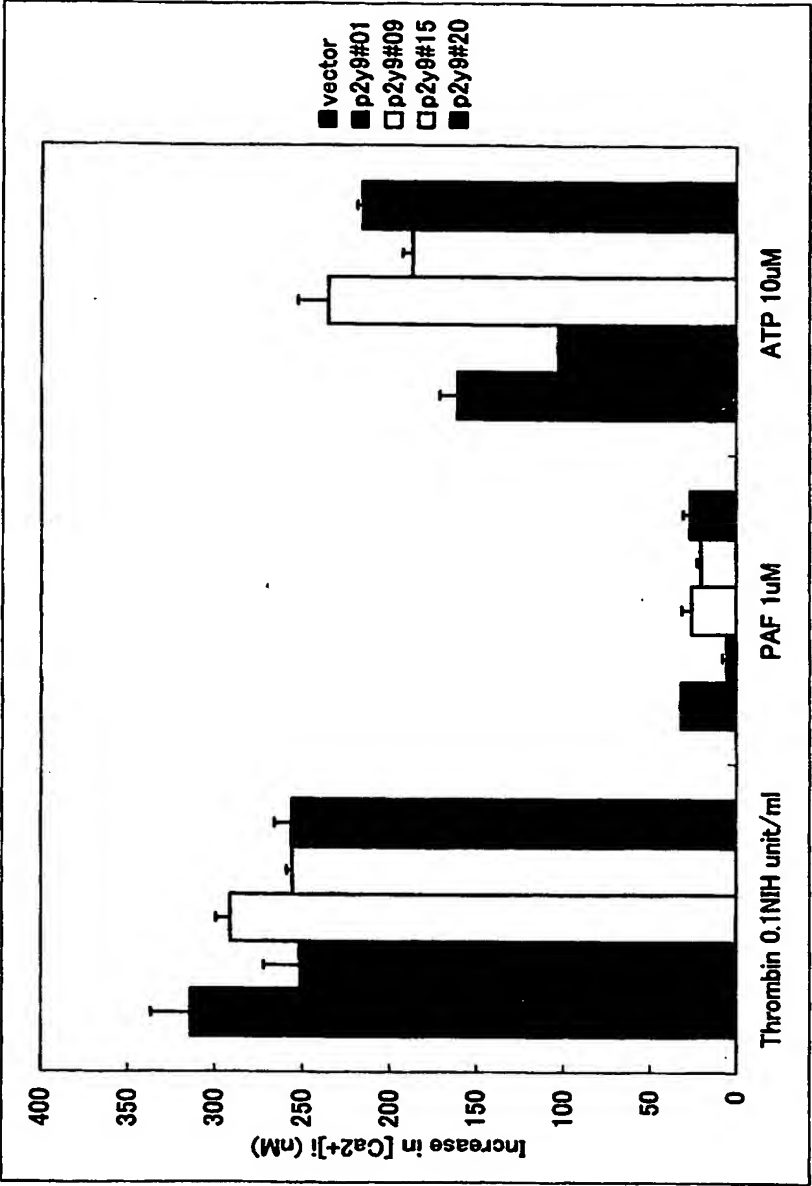



【図 11】



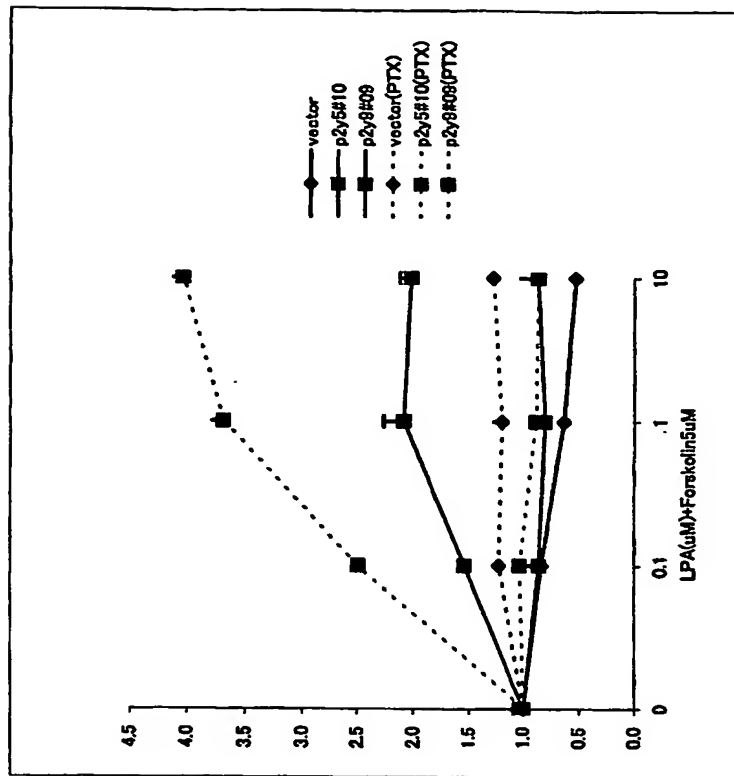


【図 12】

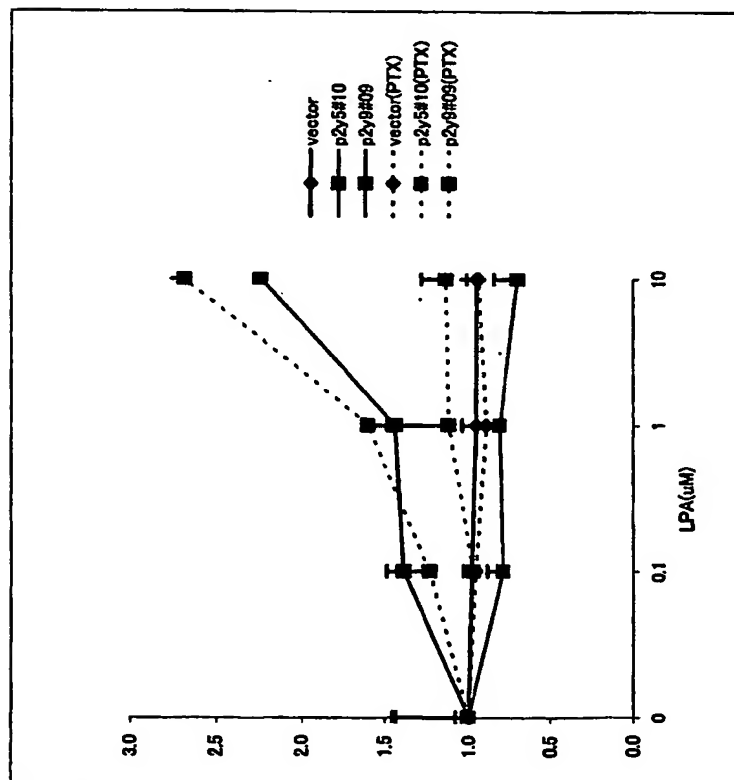




【図 1 3】



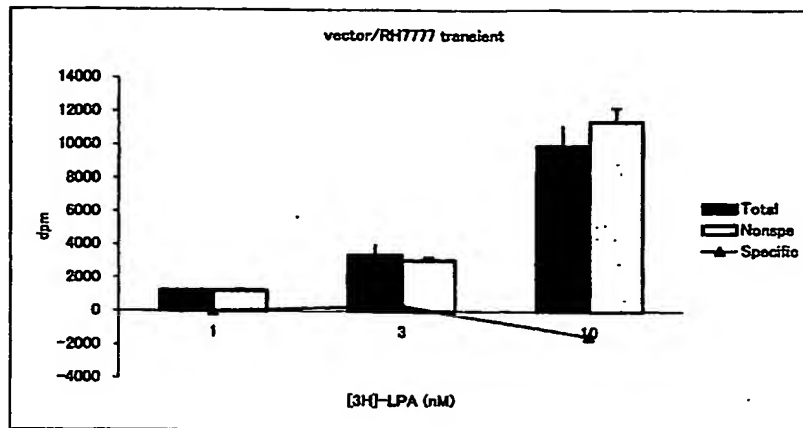
(B)



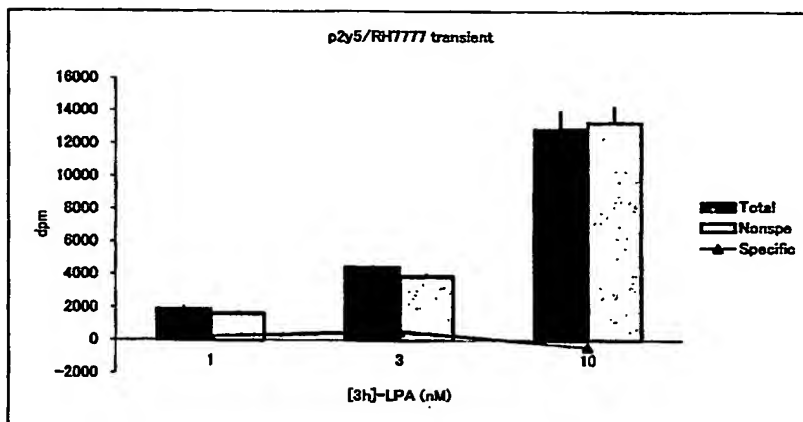
(A)

[illegible]

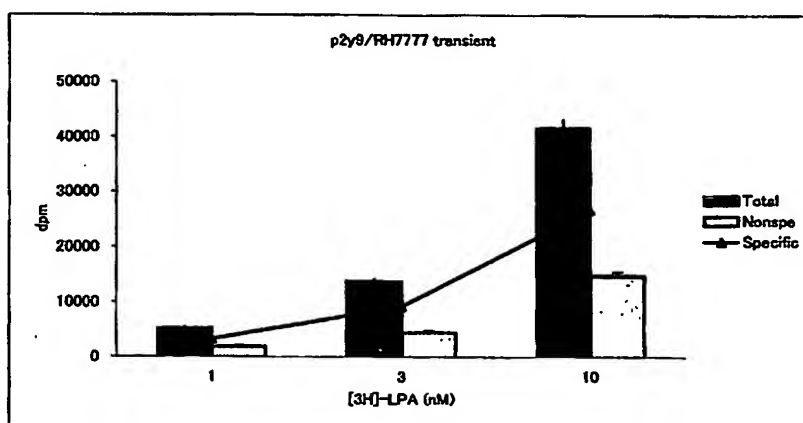
【図 15】



(A)

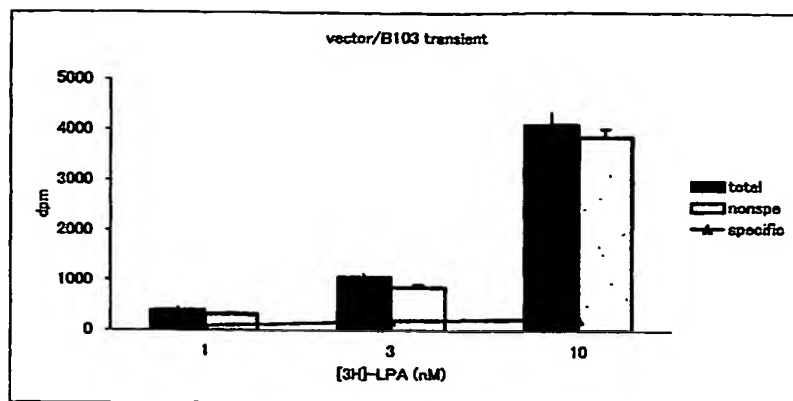


(B)

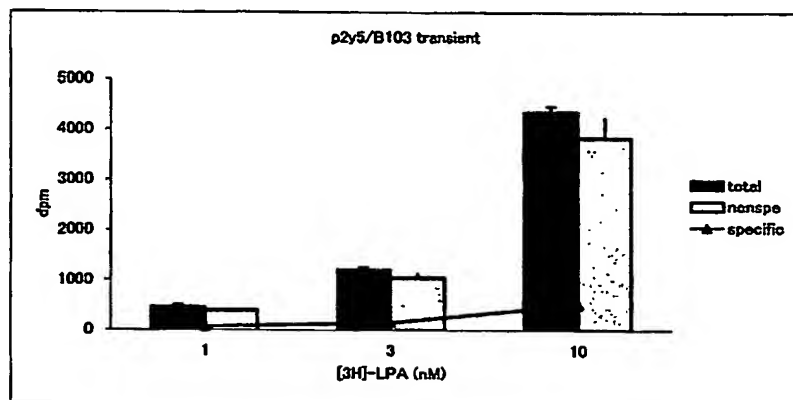


(C)

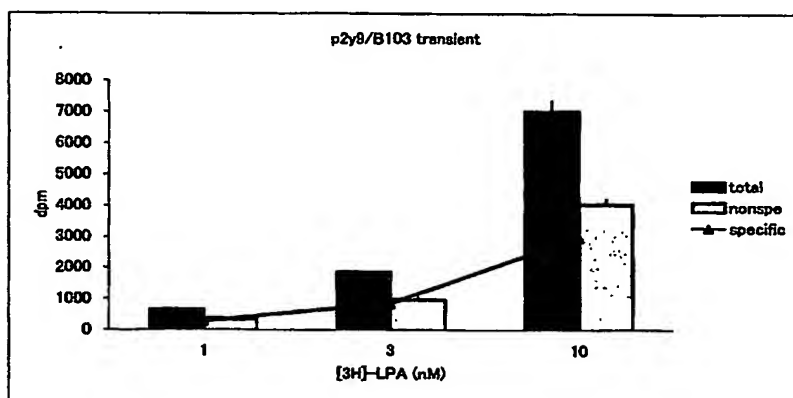
【図 16】



(A)

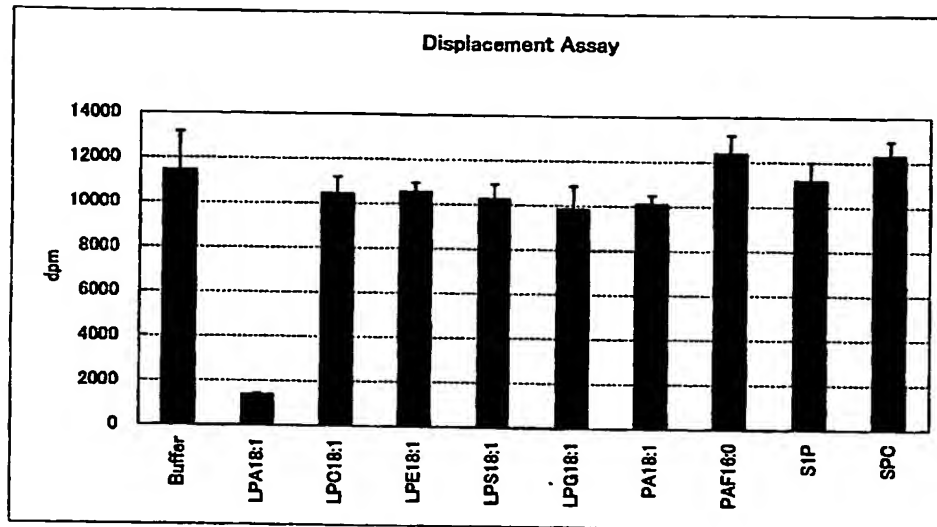


(B)

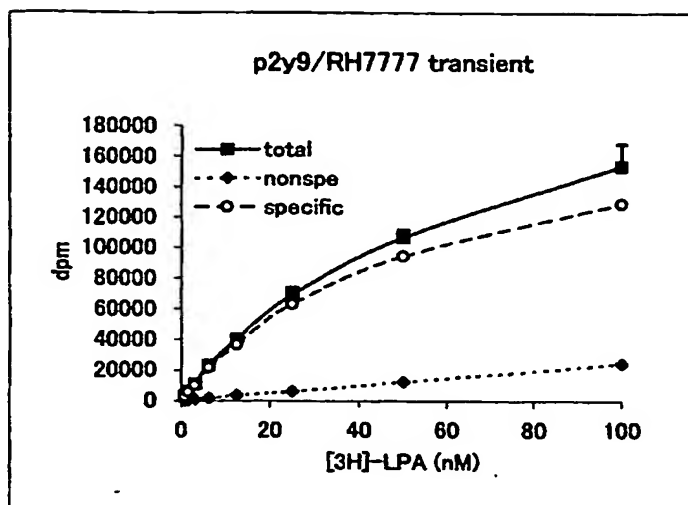


(C)

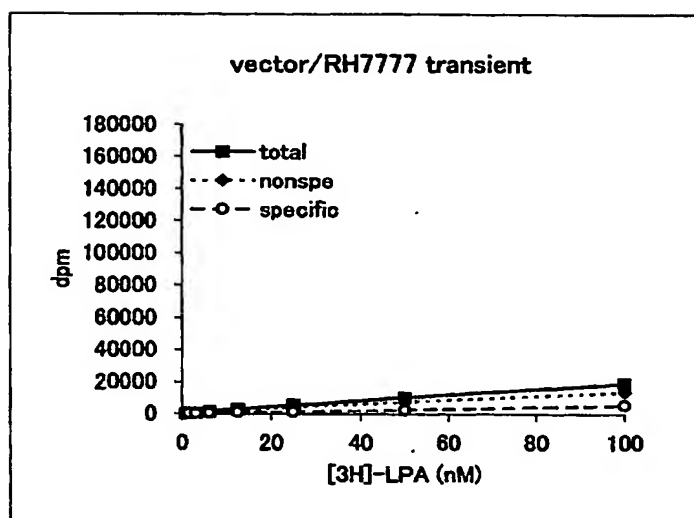
【図 17】



【図 18】



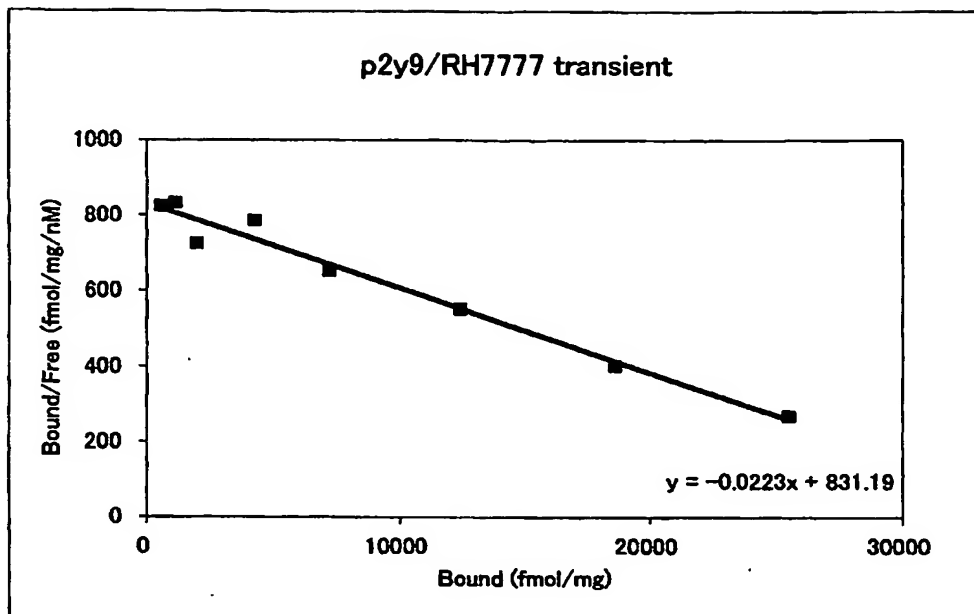
(A)



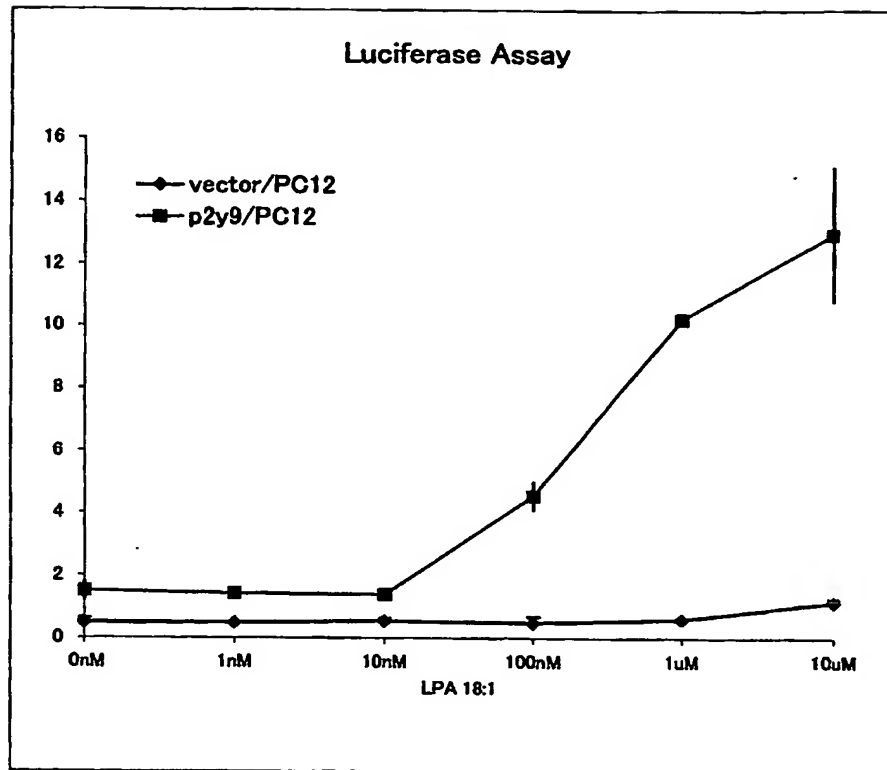
(B)



【図 19】



【図 20】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、L P Aの新規な受容体を提供するものであり、それを用いたL P A受容体拮抗剤などの医薬品のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 本発明は、Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 からなるリゾホスファチジン酸 (L P A) 受容体としての用途に関する。より詳細には、Gタンパク質共役型タンパク質 p 2 y 9 のリゾホスファチジン酸 (L P A) 受容体としての使用に関する。また、本発明は、前記した本発明のL P A受容体を用いて、当該受容体に対する作動物質又は拮抗物質をスクリーニングする方法に関する。

【選択図】 なし

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)  
【提出日】 平成15年10月31日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003- 7657  
【承継人】  
【識別番号】 503360115  
【住所又は居所】 埼玉県川口市本町四丁目1番8号  
【氏名又は名称】 独立行政法人科学技術振興機構  
【代表者】 沖村 憲樹  
【連絡先】 〒102-8666 東京都千代田区四番町5-3 独立行政法人科学技術振興機構 知的財産戦略室 佐々木吉正 TEL 03-5214-8486 FAX 03-5214-8417

【提出物件の目録】  
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。  
【物件名】 登記簿謄本 1  
【援用の表示】 平成15年10月31日付提出の特第許3469156号にかかる一般承継による移転登録申請書に添付のものを援用する。

特願 2003-007657

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

特願 2003-007657

出願人履歴情報

識別番号

[503360115]

1. 変更年月日

2003年10月 1日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

独立行政法人 科学技術振興機構